

**Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen**

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin

**Identifizierung neuer Genprodukte mit einem Einfluss
auf humane hämatopoetische Stamm- und
Vorläuferzellen**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften in der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Sören Karsten Jansen
aus Berlin
2013

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. rer. nat. B. Giebel

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. D. W. Beelen

3. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr med. K. Fleischhauer

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juni 2014

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Als Abstract unter dem Titel „Role of tetraspanins on primitive human hematopoietic cells.” In HUMAN GENE THERAPY Volume: 20 Issue: 11 Pages: 1469-1469

Als Abstract unter dem Titel „ Impacts of tetraspanins on primitive human hematopoietic cells.” In VOX SANGUINIS Volume: 99 Supplement: 1 Pages: 502-502

Kongressbeiträge

Zeidler, S., von Levetzow, G., Görgens, A., Hanenberg, H., Horn, P.A., und Giebel, B.: “Analysis of transcription factors differentially expressed in the primitive human hematopoietic compartment”. 5th International Meeting of the Stem Cell Network NRW, März 2009, Aachen.

Jansen, S., Görgens, A., Horn, P.A. und Giebel, B.: “Impacts of tetraspanins on primitive human hematopoietic cells”. Combined Meeting of the ESGCT, GSZ, DG-GT and ISCT, November 2009, Hannover.

Jansen, S., von Levetzow, G., Görgens, A., Hanenberg, H., Horn, P.A., und Giebel, B.: “Analysis of transcription factors differentially expressed in the primitive human hematopoietic compartment”. 5th Annual Meeting of the German Society for Stem Cell Research, Oktober 2010, Lübeck.

Jansen, S., von Levetzow, G., Görgens, A., Hanenberg, H., Horn, P.A., und Giebel, B.: “Analysis of transcription factors differentially expressed in the primitive human hematopoietic compartment”. 6th International Meeting of the Stem Cell Network NRW, April 2011, Essen.

Sören Jansen, Peter. A. Horn and Bernd Giebel:
“Impacts oftetraspanins on primitive human hematopoietic cells”. 8. Forschungstag der medizinischen Fakultät, November 2009, Essen

Sören Jansen, Peter. A. Horn and Bernd Giebel:
“Identification of novel factors controlling the decision self-renewal versus differentiation of somatic stem- and progenitor cells”. 9. Forschungstag der medizinischen Fakultät, November 2010, Essen

Sören Jansen, Peter. A. Horn and Bernd Giebel:
“Subcellular localization of tetraspanin-EGFP fusion proteins in different cell types“. 10. Forschungstag der medizinischen Fakultät, November 2011, Essen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Somatische Stamm- und Vorläuferzellen	8
1.2	Selbsterneuerung und Differenzierung von Stammzellen	8
1.3	Modelle der Regulation: Stammzellnische und asymmetrische Zellteilung.....	9
1.4	Hämatopoetische Stammzellen und Hämatopoese	11
1.5	Der Phänotyp hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen	12
1.6	Der Stammzellsurrogatmarker Prominin-1 (CD133).....	13
1.7	Neues Modell der Hämatopoese	14
1.8	Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoese	15
1.9	Genexpressionsanalysen und Suche nach Kandidatengenen.....	16
1.10	Asymmetrische Zellteilung und Tetraspanine	19
1.11	Tetraspanine.....	19
1.12	Tetraspanine, Exosomen und das endosomale System.....	23
1.13	Zielsetzung.....	24
2	Material und Methoden	26
2.1	Material.....	26
2.1.1	Geräte	26
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.3	Chemikalien	27
2.1.4	Medien und Medienzusätze.....	29
2.1.5	Puffer und Lösungen	30
2.1.6	Molekularbiologische Reaktionssysteme/Kits	30
2.1.7	Enzyme	30
2.1.8	Oligonukleotide.....	31
2.1.9	Antikörper	34
2.1.10	Plasmide.....	35
2.1.11	Plasmide zur Herstellung virushaltiger Überstände.....	36
2.1.12	Zellen und Zelllinien.....	37
2.1.13	Computerprogramme	38
2.1.14	Statistik	39
2.2	Methoden der Zellkultur	39
2.2.1	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	39
2.2.2	Kultivierung von Zellen	39
2.2.3	Isolation von mononukleären Zellen aus Nabelschnurrestblut.....	39
2.2.4	Anreicherung von CD34 ⁺ Zellen.....	40

2.2.5	Herstellung virushaltiger Überstände	41
2.2.6	Transduktion von CD34 ⁺ Zellen mit virushaltigem Überstand	42
2.2.7	Transduktion von FaDu-, N-KM- und THP-1-Zellen mit virushaltigem Überstand.	43
2.2.8	Durchflusszytometrische Sortierung von transduzierten Zellen	43
2.2.9	Durchflusszytometrie	43
2.2.10	Färbungen von Zellen für durchflusszytometrische Analysen.....	45
2.2.11	Bestimmung der absoluten Zellzahlen	45
2.3	Immunzytochemische Methoden	45
2.3.1	Extrazelluläre indirekte Antikörper-Färbung von Zellen	45
2.3.2	Intrazelluläre indirekte Antikörper-Färbung von Zellen	46
2.4	Mikrobiologische Methoden	46
2.4.1	Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	46
2.4.2	Transformation von transformationskompetenten Bakterien	47
2.4.3	Kultivierung von <i>E.coli</i>	47
2.5	Molekularbiologische Methoden	47
2.5.1	Isolation von Gesamt-RNA	47
2.5.2	Reverse Transkription/cDNA-Synthese	48
2.5.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	49
2.5.4	Standard PCR	49
2.5.5	Touch-Down PCR	50
2.5.6	Gelelektrophorese von DNA	51
2.5.7	Aufreinigung von PCR-Fragmenten und enzymatisch gespaltener DNA aus Agarosegelen.	52
2.5.8	Aufreinigung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation)	52
2.5.9	Aufreinigung von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxipräparation)	53
2.5.10	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	53
2.5.11	Sequenzierung von DNA	54
2.5.12	Enzymatische Spaltung von DNA	54
2.5.13	Ligation von DNA-Fragmenten in bakterielle Plasmide	54
2.6	Konstruktion von Expressionsplasmiden.....	55
2.7	Proteinbiochemische Methoden.....	57
2.7.1	SDS-PAGE.....	57
2.7.2	Aufreinigung von Proteinen aus Zelllysaten	57
2.7.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	57
2.7.4	Präparation des Polyacrylamidgels	57
2.7.5	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	58
2.7.6	Proteintransfer auf eine PVDF-Membran (Western Blot).....	58

2.7.7	Antikörperdetektion.....	59
2.7.8	Inaktivierung der <i>horseradish peroxidase</i> – HRP	59
3	Ergebnisse	60
3.1	Vorarbeiten	60
3.2	Generierung lentiviraler Vektoren	60
3.2.1	Generierung der cDNA ausgewählter Kandidatengene.....	61
3.2.2	Konzeption spezifischer Oligonukleotide	61
3.3	Effekte von Transgenen auf das Entwicklungspotential von transduzierten CD34 ⁺ Zellen	67
3.4	Tetraspanine als molekulare Werkzeuge	90
3.5	Generierung lentiviraler Vektoren	91
3.5.1	Generierung von cDNA Banken	92
3.5.2	Konzeption der Fusionsproteine.....	92
3.6	Subzelluläre Lokalisation von Tetraspanin-Fusionsproteinen mit Bezug zum endosomalen System	94
3.6.1	Endogene Tetraspaninexpression von verschiedenen Zelllinien.....	96
3.6.2	Stabile Transduktion und Sortierung von Zellen.....	100
3.6.3	Durchflusszytometrische Analysen stabil transduzierter Zellen	102
3.6.4	Proteinbiochemische Analysen stabil transduzierter Zellen.....	107
3.7	Mikroskopische Analysen stabil transduzierter Zellen.....	109
3.7.1	Immunzytochemische Färbungen stabil transduzierter Zellen.	110
4	Diskussion	128
4.1	Effekte nach Überexpression stammzellspezifisch exprimierter Faktoren in CD34 ⁺ Zellen	129
4.1.1	Gruppe A (SOX2, SOX11)	129
4.1.2	Gruppe B (BHLHB2, SNAI2, SOX9).....	131
4.1.3	Gruppe C (CEBPD, KLF4, ZNF281).....	132
4.1.4	Abweichende Daten von CD133 ⁺ Populationen	137
4.2	Analyse von Tetraspanin-eGFP Fusionsproteinen	137
4.2.1	Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine als molekularbiologische Werkzeuge	137
4.2.2	Subzelluläre Lokalisation von Tetraspanin-eGFP Fusionsproteinen	140
4.2.3	Wechselbeziehung von Tetraspaninen und dem endosomalen System.....	142
5	Zusammenfassung.....	146
6	Literaturverzeichnis.....	147
7	Anhang	166

7.1	Abbildungsverzeichnis	166
7.2	Tabellenverzeichnis	169
7.3	Verwendete Vektorplasmide.	171
7.4	Immunzytochemische Färbungen an transduzierten FaDu- und THP1-Zellen	174
7.5	Effekte von Transgenen auf das Entwicklungspotential von CD34 ⁺ Zellen.....	178
8	Danksagung.....	197

1 Einleitung

1.1 Somatische Stamm- und Vorläuferzellen

Zellen und Gewebe von multizellulären Organismen befinden sich in Homöostase. Durch externe Einflüsse, Alterung und natürlichen Umsatz gehen Zellen verloren und werden ersetzt. So gibt es Zellpopulationen, die im Zuge des natürlichen Umsatzes fortwährend sterben bzw. verloren gehen und ersetzt werden. Der Mensch bildet ca. 2×10^{11} Erythrozyten täglich nach (Koury und Ponka 2004). Auch durch unvorhersehbare Prozesse, wie zum Beispiel Traumata oder krankheitsbedingte Einflüsse, können Zellen verloren gehen und werden in der Regel wieder ersetzt. Für die Aufrechterhaltung der Homöostase verschiedener Zellen und Gewebe sind spezifische adulte bzw. somatische Stammzellen verantwortlich. Sie gewährleisten eine kontinuierliche Versorgung an benötigten Zellen eines adulten Organismus.

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die die Fähigkeit besitzen, sich über einen längeren Zeitraum selbst zu erneuern. Außerdem sind sie in der Lage, Vorläuferzellen hervorzubringen, die sich im weiteren Entwicklungsverlauf zu spezialisierten Zellen differenzieren können (Till und McCulloch 1980; Osawa et al. 1996; Wilson und Trumpp 2006).

Die spezialisierten Zellen sind an der Geweberegeneration beteiligt, während die Funktion der Selbsterneuerung ein Reservoir an Stammzellen bewahrt.

1.2 Selbsterneuerung und Differenzierung von Stammzellen

Um die Homöostase zwischen Zellverlust und Zellerneuerung aufrecht zu halten, ist ein streng reguliertes Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung von Stammzellen erforderlich. Eine Minderung der Stammzellaktivität bzw. Beeinträchtigungen der Selbsterneuerungskapazitäten, wie z.B. während des Alterungsprozesses, kann im Extremfall zu einer Degeneration von Geweben führen (Ruzankina und Brown 2007; Sharpless und DePinho 2007; Rossi et al. 2008). Andererseits kann auch eine unkontrollierte Proliferation von Stammzellen fatale Folgen für den Organismus haben. Verschiedene Publikationen zeigen auf, dass solche unkontrollierten Stammzell-Proliferationen die Ursache für bestimmte maligne Krebserkrankungen sein können (Clevers 2011; Hanahan und Weinberg 2011; Greaves und Maley 2012).

Die Mechanismen, die das Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung steuern, sind bis heute weitgehend ungeklärt. Hieraus ergeben sich

wichtige Fragen der heutigen Stammzellbiologie: Wie wird das Equilibrium zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung von Stammzellen gesteuert? Kann man in diese Steuerungsmechanismen eingreifen und das Verhältnis zwischen Selbsterneuerung *versus* Differenzierung beeinflussen?

1.3 Modelle der Regulation: Stammzellnische und asymmetrische Zellteilung

Das Zellschicksal einer Zelle kann sowohl von äußeren (extrinsischen) als auch inneren (intrinsischen) Faktoren beeinflusst werden. Zwei geläufige Modelle, die die Selbsterneuerung *versus* Differenzierung von Stammzellen beschreiben, sind die der „Stammzellnische“ und der „asymmetrischen Zellteilung“.

Die Stammzellnische bezeichnet eine klar definierte Umgebung (*microenvironment*), in der die Stammzellen bestimmten extrinsischen Signalen ausgesetzt sind, die das Selbsterneuerungs- bzw. Selbsterhaltungspotential unterstützen. Verlässt eine Stammzelle z.B. nach der Zellteilung diese definierte Umgebung und ist somit nicht mehr den spezifischen Signalen ausgesetzt, verliert sie die Eigenschaft zur Selbsterneuerung und differenziert (Spradling et al. 2001; Lin 2002; Moore 2004; Taichman 2005; Yamashita et al. 2005; Moore und Lemischka 2006). In der Abbildung 1.01 ist die Stammzellnische schematisch dargestellt.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass im Knochenmark die als Osteoblasten bezeichneten Knochenvorläuferzellen essentiell an der Ausbildung hämatopoetischer Stammzellnischen beteiligt sind (Calvi et al. 2003; Zhang et al. 2003; Kiel et al. 2005).

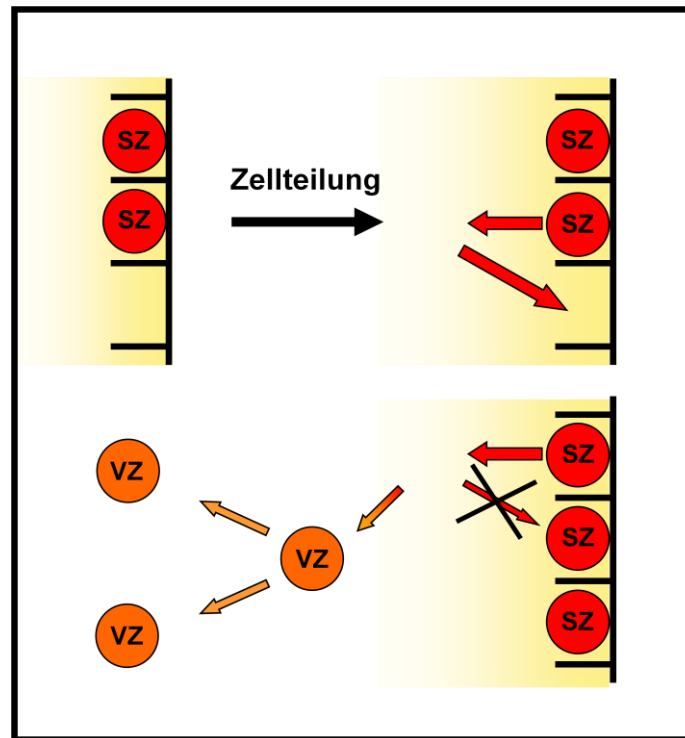


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Stammzellnische

Die Stammzellen (rot) haben Kontakt zur definierten Umgebung (schwarz + gelb). Verlässt eine Zelle diese Umgebung bzw. die Nische, z.B. während oder nach der Zellteilung, so verliert sie den Kontakt zu Nischenzellen und löslichen Faktoren. Die Zelle differenziert daraufhin und bringt Vorläuferzellen hervor (orange); Giebel 2008, modifiziert.

Dem Modell der asymmetrischen Zellteilung zufolge wird das Zellschicksal intrinsisch gesteuert. Hierbei werden vor der Zellteilung spezifische Zellschicksalsdeterminanten (z.B. mRNA und/oder Proteine) ungleich im Zytoplasma verteilt. Während der Mitose orientiert sich die Teilungsebene durch eine Rotation der mitotischen Spindel so um, dass die Determinanten während der Zellteilung ungleich auf die Tochterzellen verteilt werden (Abb. 1.2). Auf diesem Weg entstehen zwei nicht-identische Tochterzellen, von der eine das Stammzellschicksal beibehält, während die andere die Differenzierung initiiert (Betschinger und Knoblich 2004; Roegiers und Jan 2004). Die asymmetrische Zellteilung wurde bei *Drosophila melanogaster* an der Zellteilung von Neuroblasten beobachtet. In diesem Beispiel teilen sich die Neuroblasten asymmetrisch und bringen so einen Neuroblasten und eine Ganglion-Mutterzelle hervor (Betschinger et al. 2003; Wodarz und Huttner 2003; Betschinger et al. 2006).

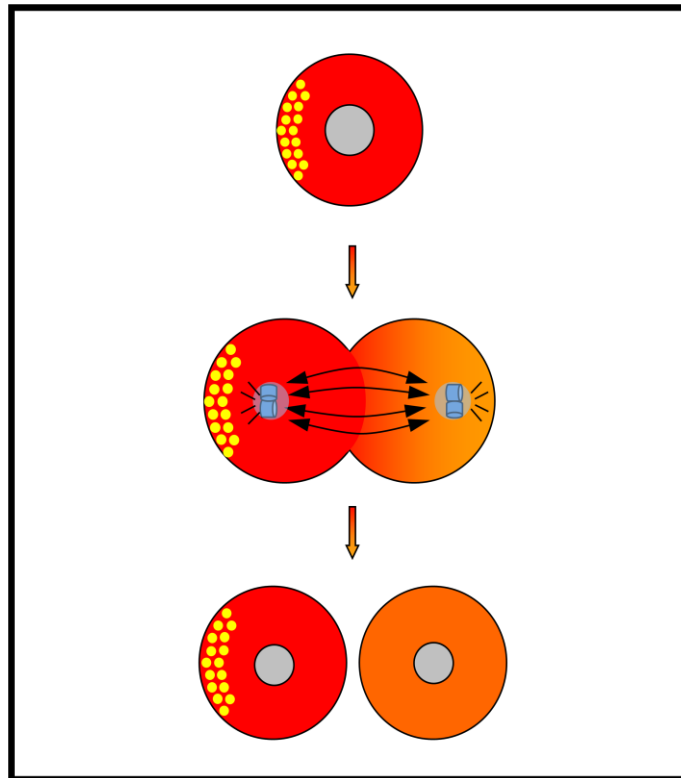


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der asymmetrischen Zellteilung

Vor der Zellteilung werden intrinsische Faktoren (gelbe Punkte) innerhalb der Zelle (rot) an einer Seite der Zelle manifestiert. Während der Zellteilung verbleiben diese Faktoren in einer der entstehenden Tochterzellen. Nach der Zellteilung sind die intrinsischen Faktoren nur in einer Tochterzelle (rot) vorhanden und beeinflussen ihr Zellschicksal (rot), während sie in der anderen Tochterzelle fehlen und ihr Einfluss in dieser Zelle ausbleibt (orange); Giebel 2008, modifiziert.

1.4 Hämatopoetische Stammzellen und Hämatopoese

Das am besten untersuchte Stammzellensystem ist das hämatopoetische System. Nach dem klassischen Modell der Hämatopoese ist das hämatopoetische System ein hierarchisch aufgebautes Organsystem, bei dem sich aus einer hämatopoetischen Stammzelle (HSZ) alle Blutzellen entwickeln können (Medvinsky und Dzierzak 1996; Kondo et al. 1997; Morrison et al. 1997; Akashi et al. 2000; Giebel und Punzel 2008). Man unterscheidet hierbei die myeloische Entwicklungslinie, die Erythrozyten, Granulozyten, Megakaryozyten, Monozyten, Makrophagen und einen Subtyp, der dendritischen Zellen hervorbringt, von der lymphatischen Entwicklungslinie, die B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen und einen weiteren Subtyp der dendritischen Zellen hervorbringt (Weissman et al. 2001; Sigvardsson 2009). In Abbildung 1.3 ist das hierarchische Modell der humanen Hämatopoese schematisch dargestellt. Hämatopoetische Stammzellen sind von besonderer medizinischer Relevanz, da sie bereits seit den 1960er Jahren für die Behandlung von an Leukämie

erkrankten Patienten nach Strahlen- bzw. Hochdosismethotherapie herangezogen werden (Thomas et al. 1959; Weissman 2000).

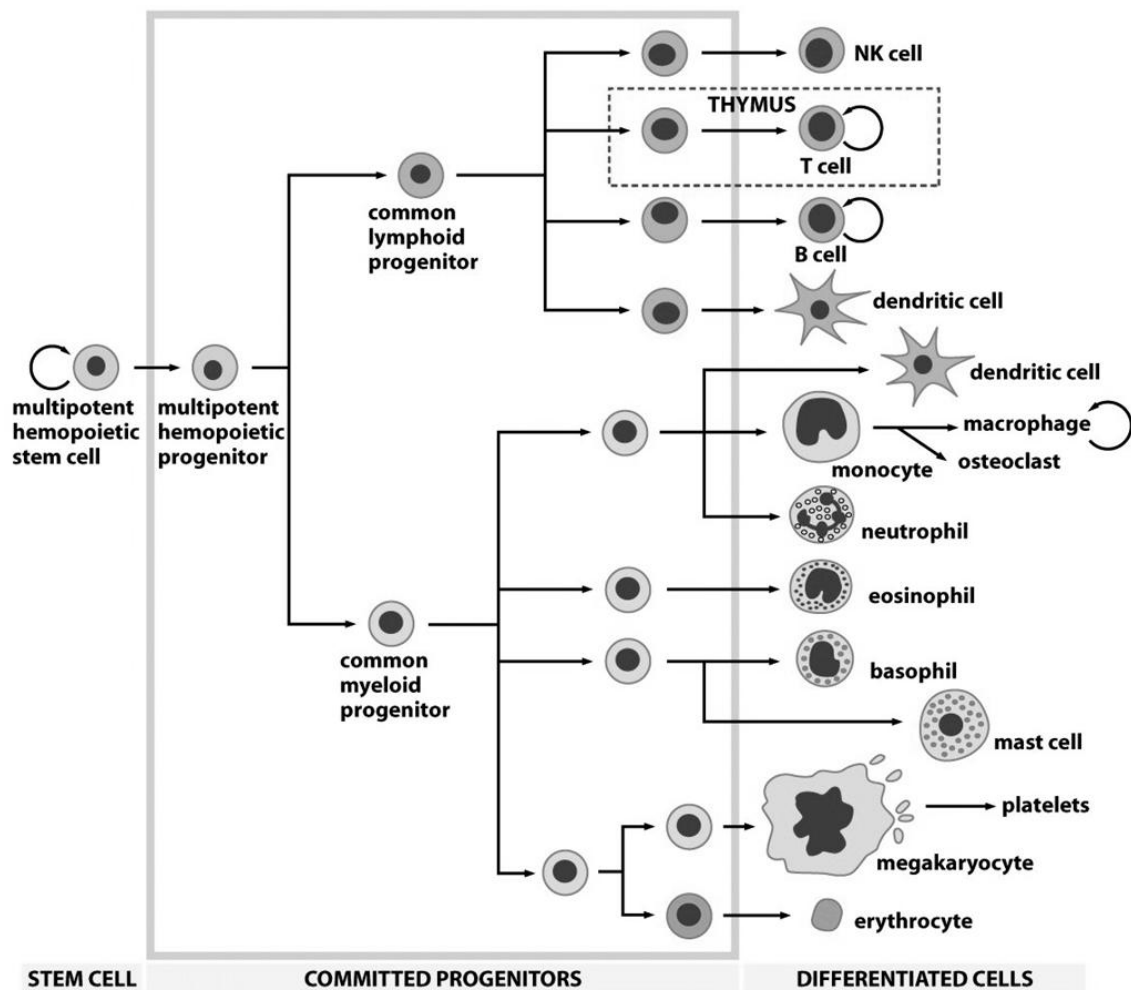


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der klassischen Hämatopoese

Eine multipotente Stammzelle teilt sich und generiert dabei entweder mehr Stammzellen, die sich selbst erneuern können, oder Linien-spezifizierte Vorläuferzellen, die in reife Blutzellen ausdifferenzieren; Bruce Alberts, B. (2007): *Molecular Biology of the Cell*, 5.Ed. New York: Taylor & Francis.

1.5 Der Phänotyp hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen

Die Unterscheidung zwischen primitiven und reiferen hämatopoetischen Zellen erfolgt anhand von bestimmten mit der Differenzierung von Zellen assoziierten Zelloberflächenproteinen, die eine *Cluster of Differentiation* (CD) Bezeichnung tragen. Das Expressionsmuster dieser Antigene auf der Zelloberfläche hämatopoetischer Zellen lässt Rückschlüsse auf den Entwicklungszustand der Zellen zu.

Im humanen hämatopoetischen System befinden sich die primitivsten hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) im Kompartiment der $CD34^+$ Zellen (Civin et al. 1984; Krause et

al. 1996). Dieses Kompartiment lässt sich weiter aufteilen in $CD34^+$ Zellen, die bereits Differenzierungsantigene für bestimmte hämatopoetische Entwicklungsrichtungen exprimieren und solche, die negativ für diese Antigene sind. Aus dem Englischen abgeleitet werden diese als *lineage negative* (lin^-) Zellen bezeichnet. Die lin^-CD34^+ Zellen wiederum sind heterogen bezüglich der Expression des Oberflächenantigens CD38 und können in $lin^-CD34^+38^+$ und $lin^-CD34^+CD38^{low/-}$ Zellen unterteilt werden. Experimente an NOD/SCID (*Non Obese Diabetic / Severe Combined Immunodeficiency*)-Mäusen zeigten, dass Zellen mit dem Potenzial langfristig ein humanes hämatopoetisches System im Knochenmark dieser Mäuse zu initiieren, in der $lin^-CD34^+CD38^{low/-}$ -Zellfraktion angereichert sind, während die Fraktion der $lin^-CD34^+CD38^+$ Zellen im Wesentlichen hämatopoetische Vorläuferzellen (HVZ) enthält, die nicht über dieses Potential verfügen (Bhatia et al. 1997; Dick et al. 1997).

Die heterogene Population von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSVZ) kann mit Hilfe des Oberflächenmoleküls CD133 weiter diskriminiert werden. Eine aus Nabelschnurrestblut angereicherte $CD34^+CD133^+$ -Zellpopulation ist in der Lage, in NOD/SCID-Mäusen ein hämatopoetisches System zu rekonstituieren. (Yin et al. 1997; Corbeil et al. 1998; de Wynter et al. 1998; Gallacher et al. 2000). Innerhalb des Kompartiments von $CD34^+$ Zellen markiert CD133 eher eine primitivere HSVZ-Population (Giebel et al. 2006; Beckmann et al. 2007; Ito et al. 2010). Allerdings exprimieren auch andere gewebsspezifische Zellen dieses Oberflächenmolekül (Shmelkov et al. 2005; Shmelkov et al. 2005).

Da sich im Kompartiment der $CD34^+$ Zellen die meisten HSZ befinden, wurden in dieser Arbeit $CD34^+$ Zellen aus Nabelschnurrestblut aufgereinigt. Da mit Hilfe des Oberflächenantigens CD133 eine weitere primitive Subpopulation innerhalb der $CD34^+$ Zellen identifizierbar ist, wurde dessen Expression bei Experimenten mit $CD34^+$ Zellen beobachtet.

1.6 Der Stammzellsurrogatmarker Prominin-1 (CD133)

Es wurde bereits beschrieben, dass etwa 80% frisch isolierte $CD34^+$ Zellen aus Nabelschnurrestblut den Stammzellsurrogatmarker Prominin-1 (CD133) exprimieren. Nach den ersten Zellteilungen in Kultur entsteht aus den $CD34^+CD133^+$ Zellen eine $CD34^+CD133^{low}$ Population. Im weiteren Verlauf der Kultivierung nimmt diese Population zunächst zu, um schließlich zu $CD34^-CD133^-$ Zellen heran zu reifen (Giebel et al. 2006; Beckmann et al. 2007; Görgens et al. 2013). Kürzlich konnte gezeigt

werden, dass sowohl multipotente Progenitoren (MPP), als auch Granulozyten-Makrophagen Progenitoren (GMP) der Fraktion von $CD34^+CD133^+$ Zellen angehören. Erythro-myeloische Progenitoren sind in der $CD34^+CD133^{low}$ Fraktion zu finden (Görgens et al. 2013). Diese Ergebnisse deuten auf ein neues Modell der Hämatopoese hin (siehe folgendes Kapitel 1.7).

1.7 Neues Modell der Hämatopoese

Neue Daten aus unserer Arbeitsgruppe deuten auf ein verändertes hämatopoetisches Modell hin. Nach dem klassischen hämatopoetischen Modell trennen sich zunächst die lymphatische und die myeloische Linie voneinander, wobei sich der myeloische Vorläufer weiter aufteilt in Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitorzellen (MEP) und Granulozyten-Makrophagen-Progenitorzellen (GMP). Dieses Modell ist mit den neueren Erkenntnissen nicht zu vereinbaren. Den Daten unserer Arbeitsgruppe zufolge trennen sich zunächst lymphatisch-myeloische (LMPP) und erythro-myeloische (EMP) Linien voneinander. In der Abbildung 1.4 ist das neue Modell im Vergleich zum klassischen Modell der Hämatopoese dargestellt. Der Verlust der Expression von CD133 ist in dem neuen Modell ein Merkmal für die Segregation des erythro-myeloischen Linienpotenzials.

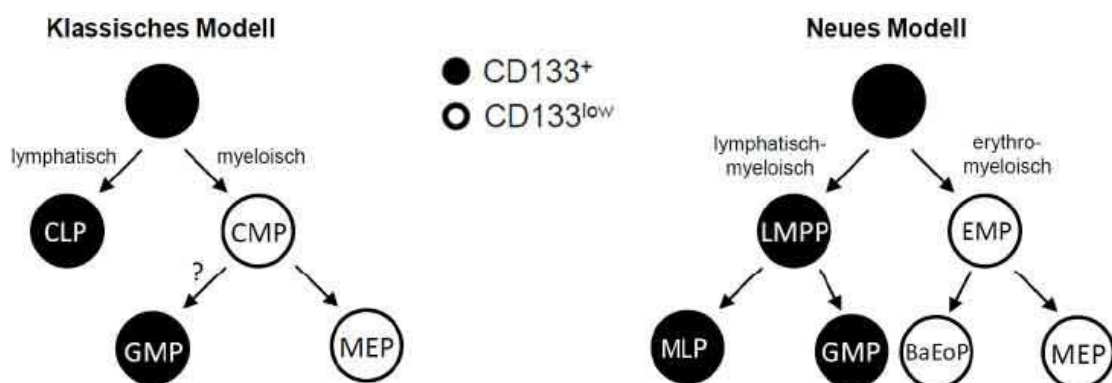


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der klassischen und neuen Hämatopoese.

In dem klassischen Modell findet eine erste Auftrennung in lymphatische Vorläufer- (common lymphoid progenitor, CLP) und myeloische Vorläuferzellen (common myeloid progenitor, CMP) statt. Der CMP trennt sich daraufhin weiter in Granulozyten-Makrophagen-Progenitoren (GMP) und Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitoren (MEP) auf (Akashi et al. 2000; Manz et al. 2002). In dem neuen Modell der Hämatopoese findet eine initiale Auftrennung in lymphatisch-myeloische und erythro-myeloische Progenitoren statt. Die lymphatisch-myeloischen Progenitoren (LMPP) bringen danach allen lymphatischen Zellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten hervor, wohingegen aus den erythro-myeloischen Progenitoren (EMP) Erythrozyten, Megakaryozyten, Makrophagen, eosinophile- und basophile Granulozyten hervorgehen. Der Verlust der CD133 Oberflächenexpression zeigt in dem neuen Modell die Segregation des erythro-myeloischen Linienpotenzials an; Görgens 2013.

1.8 Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoese

Wie eingangs erwähnt, spielt die Frage nach den Mechanismen, die die Entscheidung zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung von Stammzellen regulieren, eine zentrale Rolle im Bereich der Stammzellbiologie. So ist es bis heute nicht möglich, humane HSZ als solche zu isolieren und über einen längeren Zeitraum undifferenziert zu kultivieren, da ihr Phänotyp und die Bedingungen, die einen Stammzellerhalt ermöglichen, noch nicht eindeutig aufgeklärt sind.

Aufschluss über die Regulationsmechanismen von HSZ könnten hier Transkriptionsfaktoren geben, die spezifisch in HSZ exprimiert werden. Ein Transkriptionsfaktor ist ein Protein das sequenzspezifisch an DNA bindet und die Transkription reguliert (Karin 1990; Latchman 1997). Dabei kann ein Transkriptionsfaktor diese Funktion allein oder in einem Komplex aus mehreren Proteinen ausüben, indem er die Initiation der Transkription durch eine RNA-Polymerase fördert oder blockiert (Roeder 1996; Nikolov und Burley 1997; Lee und Young 2000). Transkriptionsfaktoren besitzen eine oder mehrere DNA-Bindedomänen, die an spezifische Sequenzen der DNA binden (Mitchell und Tjian 1989; Ptashne und Gann 1997).

So konnte gezeigt werden, dass Transkriptionsfaktoren wie z.B. Proteine der Hox Familie an der Regulation des Stammzellpools von HSZ beteiligt sind (Antonchuk et al. 2002; Klump et al. 2005; Schiedlmeier et al. 2007). *Hox*-Gene stellen eine evolutiv hoch konservierte Gruppe von Transkriptionsfaktoren dar (Gehring et al. 2009). Es existieren 39 verschiedene *Hox*-Gene im Menschen, die in vier Clustern (A, B, C, D) im Genom angeordnet sind (Hoegg und Meyer 2005; Kuraku und Meyer 2009). Die Aktivität von *Hox*-Genen während der Hämatopoese wurde mit Hilfe von Expressionsanalysen während der Entwicklung von hämatopoetischen CD34⁺-Zellen

gezeigt (Vieille-Grosjean et al. 1992; Sauvageau et al. 1994; Zhu et al. 2003). Zudem werden in bestimmten Leukämieformen verschiedene *Hox*-Gene differenziell exprimiert (Abramovich und Humphries 2005; Abramovich et al. 2005). Eine ektope Expression von *HoxB4* führte zu einer profunden HSZ-Expansion *in vitro* und *in vivo* im murinen Knochenmark (Antonchuk et al. 2001; Antonchuk et al. 2002; Kyba et al. 2002).

Des weiteren konnten mit Hilfe von vier Transkriptionsfaktoren (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, und *c-Myc*) Takahashi und Yamanaka 2007 eine „Reprogrammierung“ von humanen dermalen Fibroblasten zu sogenannten iPS-Zellen (*induced pluripotent stem cells*) erreichen, die die pluripotenten Charakteristika von embryonalen Stammzellen aufweisen (Takahashi et al. 2007). In anderen Laboren wurden CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurrestblut mit nur zwei dieser Transkriptionsfaktoren (*Oct3/4* und *SOX2*) zu iPS-Zellen reprogrammiert (Meng et al. 2011). Die Beispiele zeigen, dass Transkriptionsfaktoren die Differenzierung von Zellen maßgeblich beeinflussen können.

Viele der heute bekannten Transkriptionsfaktoren, die die Selbsterneuerung von HSZ steuern, wurden ursprünglich durch deren aberante Expression in verschiedenen Leukämien identifiziert (Orkin 1995; Shivdasani und Orkin 1996; Tenen et al. 1997; Nagamura-Inoue et al. 2001). Häufig wurden durch chromosomale Translokationen Proteine gebildet, die durch eine aberante Expression die Leukämie hervorriefen, hierzu zählen u.a. SCL/TAL-1 (Begley und Green 1999), Runx1 (Yamagata et al. 2005), GATA-2 (Gottgens et al. 2002; Yuasa et al. 2005), Evi-1 (Yuasa et al. 2005) sowie Mitglieder der ets-Familie, z.B. EWS-ETS Translokation (Janknecht 2005).

Die genannten Beispiele dokumentieren, wie sich eine aberante Expression von diversen Transkriptionsfaktoren auf das Zellschicksal von hämatopoetischen Zellen auswirkt. So ist es wahrscheinlich, dass es weitere Transkriptionsfaktoren gibt, die einen Einfluss auf die Entscheidung Selbsterneuerung *versus* Differenzierung von HSZ ausüben. In dieser Arbeit wurden Kandidatengene untersucht, um Faktoren zu identifizieren die potentiell einen Einfluss auf die Entscheidung Selbsterneuerung *versus* Differenzierung in humanen HSZ ausüben.

1.9 Genexpressionsanalysen und Suche nach Kandidatengen

Um Kandidatengene zu identifizieren, die spezifisch in den primitivsten hämatopoetischen Zellen exprimiert sind, wurden im Vorfeld dieser Arbeit Genexpressionsanalysen von primitiven hämatopoetischen Zellen aus verschiedenen

Quellen angefertigt und miteinander verglichen. Für diese Analysen wurde aus Nabelschnurrestblut, Knochenmark und peripherem Blut von G-CSF behandelten Stammzellspendern (Apheresat) primitive ($\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low}}$) und eher reife ($\text{lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+$) Vorläuferzellen, sowie reife Blutzellen (lin^+) mit Hilfe magnetischer Zellseparation und darauf folgender durchflusszytometrischer Zellsortierung isoliert (Abb. 1.5). Aus den Zellfraktionen von primitiven und reiferen Vorläuferzellen, sowie reiferen Blutzellen der verschiedenen Spenderquellen wurden umfassende Genexpressionsprofile erstellt (Bracker et al. 2006). Durch Analysen der Expressionsprofile wurden Kandidatengene identifiziert, die spezifisch in den $\text{CD34}^+ \text{CD38}^{\text{low/-}}$ angereicherten Zellfraktionen stärker exprimiert sind. Diese Daten lagen in der Arbeitsgruppe bereits vor. Da diese Gene in primitiveren Vorläuferzellen stärker detektiert wurden, ist es möglich, dass sie an dem Entwicklungsprozess Selbsterneuerung *versus* Differenzierung von HSZ beteiligt sein könnten. Es ist vorstellbar, dass sie genetische Regelkreise aktivieren oder aufrechterhalten, indem speziell Transkriptionsfaktoren die Expression weiterer Gene aktivieren und/oder reprimieren, und dadurch den undifferenzierten Zustand primitiver Zellen erhalten. Es wurde spezifisch nach Transkriptionsfaktoren gesucht, da diese aufgrund ihrer regulativen Funktionen einen Einfluss auf weitere Gene haben, und bereits für verschiedene Transkriptionsfaktoren gezeigt werden konnte, dass sie die Entwicklung von primitiven hämatopoetischen Zellen beeinflussen (siehe 1.7). Die größten relativen Expressionsunterschiede wurden unter anderem für die Gene *ATF2*, *BHLHB2*, *CBX5*, *CEBPD*, *DDIT3*, *ELF1*, *FOXP1*, *FUS*, *HHEX*, *HOPX*, *HOXA5*, *ID1*, *ID2*, *ID3*, *ID4*, *KLF2*, *KLF4*, *KLF6*, *KLF9*, *KLF10*, *KLF11*, *LMO4*, *MEOX2*, *MLLT3*, *NFIB*, *PROX1*, *SIX1*, *SMAD3*, *SNAI2*, *SOCS2*, *SOX2*, *SOX4*, *SOX9*, *SOX11*, *TCF19*, *ZNF85*, *ZNF281*, *ZNF367*, *ZNF395* gefunden.

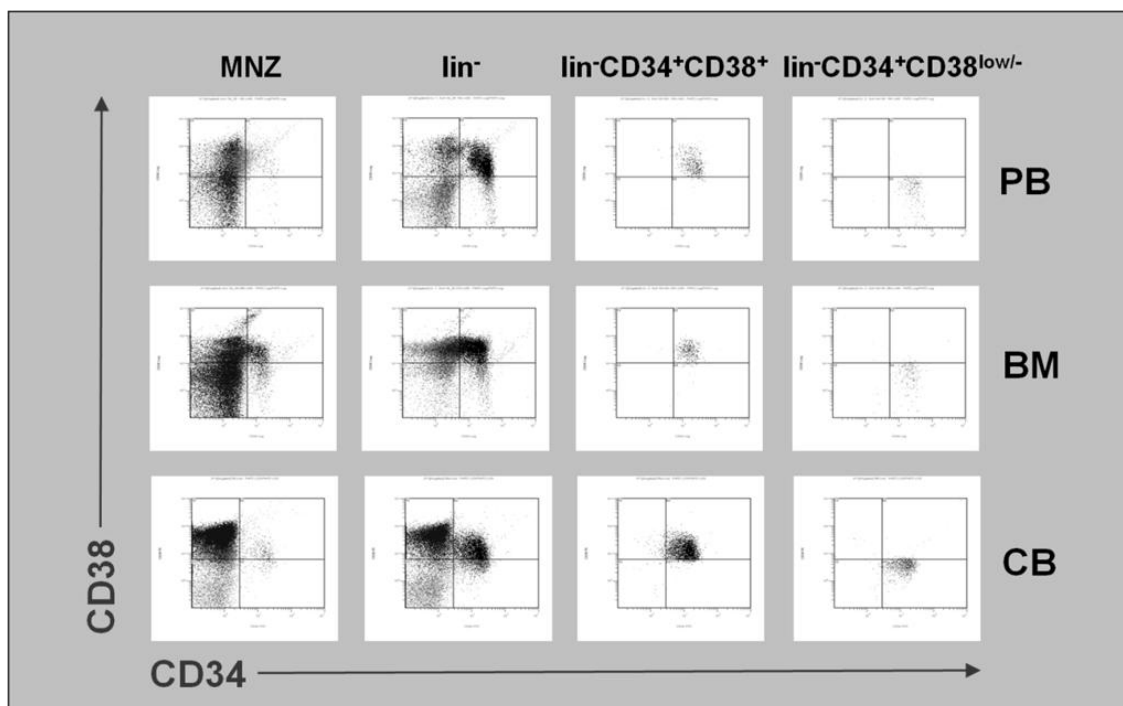


Abb. 1.5: Darstellung der Sortierungsstrategie zur Anreicherung von reiferen und primitiveren hämatopoetischen Vorläuferzellen.

Dargestellt sind die Zellfraktionen von unaufgereinigten mononukleären Zellen (MNZ) und linien-depletierten Zellen (lin^-), sowie $lin^-CD34^+CD38^{low/-}$ Zellen und $lin^-CD34^+CD38^+$ Zellen. Die Fraktionen der $lin^-CD34^+CD38^{low/-}$ Zellen und $lin^-CD34^+CD38^+$ Zellen wurden für die Erstellung der Genexpressionsprofile verwendet. Es ist die Anreicherung der Zellfraktionen aus peripherem Blut (PB), Knochenmark (BM) und Nabelschnurrestblut (CB) dargestellt. Giebel 2006.

Die ausgewählten Kandidatengene und ihre Zuordnung zu verschiedenen Transkriptionsfaktorfamilien sind in Tabelle 1.1 aufgelistet. Des Weiteren sind Tetraspanine (TSPAN) und Flotilline aufgelistet, die aufgrund von Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe ausgewählt wurden.

Tab. 1.1: Zur Analyse ausgewählte Kandidatengene

ZNF-motif	HOX	HLH-motif	SOX-fam.	Chr. Rem.	bZip	forkhead-box	SOCS-fam.	LIM-domain	TSPAN	Flotilline
KLF2	HHEX	ARNTLa	SOX2	MLLT3	DDIT3	FOXP1a	SOCS2	LMO4	CD9	FLOT1
KLF4	HOPX	ARNTLb	SOX4	CBX5	CEBP-D	FOXP1b			CD37a	FLOT2
KLF6	HOXA5	ARNTL2	SOX9	ATF2			TET Protein	NFI-fam.	CD37b	
KLF9	MEOX2	BHLHB2	SOX11				FUS	NFI-B	CD53	
KLF10	PROX1	ID1							CD53s	
KLF11	SIX1	ID1'					TGFB/SMAD	ETS fam.	CD63	
SNAI2		ID2					SMAD3	ELF1	CD81	
TCF19		ID3							CD82	
ZNF85		ID4							CD151	
ZNF281										
ZNF367										
ZNF395										

1.10 Asymmetrische Zellteilung und Tetraspanine

Nachdem das Prinzip der asymmetrischen Zellteilung, wie bereits erwähnt, in Modelorganismen demonstriert wurde, konnte gezeigt werden, dass sich auch humane HSVZ asymmetrisch teilen können (Beckmann et al. 2007). In diesen Experimenten wurde durchflusszytometrisch die Oberflächenexpression von verschiedenen Antigenen auf CD34⁺CD133⁺ und CD34⁺CD133^{low} Zellen beobachtet. Es konnten vier Proteine identifiziert werden (CD53, CD62L, CD63 und CD71), die in 20% der sich langsam teilenden primitiven hämatopoetischen CD34⁺ Zellen asymmetrisch auf die Tochterzellen verteilt wurden. Dies entspricht der Häufigkeit mit der sich primitive HSVZ nach einer Zellteilung unterschiedlich voneinander entwickeln (Mayani et al. 1993; Brummendorf et al. 1998; Punzel et al. 2002). Zwei der vier Proteine, CD53 und CD63, gehören zu der Familie der Tetraspanine und sind assoziiert mit dem endosomalen Kompartiment der Zelle (Arribas und Cutler 2000; Kobayashi et al. 2000).

1.11 Tetraspanine

Die Familie der Tetraspanin-Moleküle wurde zum ersten Mal 1990 beschrieben. In diesen Arbeiten wurde festgestellt, dass die primäre Aminosäuresequenz von zwei neu analysierten Molekülen auffallend ähnlich war zu den zuvor entdeckten Tumorantigenen CD63 und CD37 (Hotta et al. 1988; Classon et al. 1990; Oren et al. 1990; Wright et al. 1990). Tetraspanine kommen in allen Metazoa vor. So gibt es 36 Tetraspanine in *Drosophila melanogaster*, 20 in *Caenorhabditis elegans* und 25 in dem humanen Parasiten *Schistosoma mansoni* (Fradkin et al. 2002; Huang et al. 2005; Tran et al. 2006; Garcia-Espana et al. 2008). In dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* wurden Tetraspanin-ähnliche Proteine nachgewiesen, die in der Pflanzenentwicklung von Bedeutung sind (Olmos et al. 2003; Cnops et al. 2006). Im Menschen sind derzeit 33 Tetraspanine bekannt, von denen acht in die CD-Nomenklatur aufgenommen wurden (Huang et al. 2005; Yanez-Mo et al. 2009). Hierzu gehören CD9, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82, CD151, sowie CD231.

Tetraspanine sind Transmembranproteine mit einer Größe von 200 bis 350 Aminosäuren. Ihre konservierten molekularen Eigenschaften beinhalten vier hydrophobe Transmembrandomänen, in denen die höchste Sequenzhomologie zu finden ist. Diese vier Domänen sind für die Integration eines Tetraspanin in der Zellmembran verantwortlich. Die extrazellulären Anteile bestehen aus zwei Schleifen von

unterschiedlicher Ausdehnung bzw. Größe (Stipp et al. 2003; Yanez-Mo et al. 2009). Zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne findet sich eine kleine intrazelluläre Schleife. Die C- und N-Termini sind intrazellulär lokalisiert (Stipp et al. 2003).

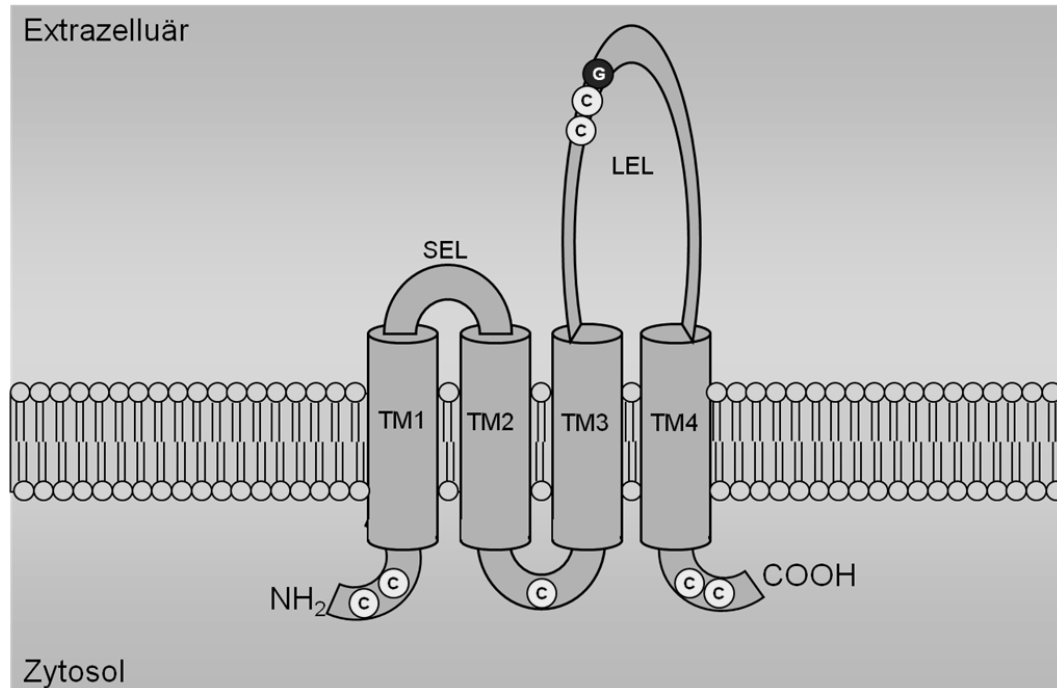


Abb. 1.5: Schematische Darstellung eines Tetraspanins innerhalb der Zellmembran. Die Abbildung zeigt die vier Transmembrandomänen (TM1-TM4), eine intra- und zwei extrazelluläre Schleifenstrukturen (*small extracellular loop SEL*, *large extracellular loop LEL*) und die intrazellulären C- und N-Termini. Das zu 100% konservierte CCG-Motiv ist im Bereich der LEL lokalisiert (Stipp et al. 2003).

Von funktioneller Bedeutung ist die große extrazelluläre Schleife (*large extracellular loop LEL*). Diese besteht aus einem konstanten Abschnitt, der aus drei α -Helices besteht, und einem variablen Abschnitt, der zwei α -Helices ausbilden kann (Stipp et al. 2003). Die konstante Region der LEL ist womöglich an der Ausbildung von Tetraspanin-Homodimeren beteiligt, wohingegen die variable Region für Bindungen an andere Proteine verantwortlich ist (Boucheix und Rubinstein 2001; Hemler 2001; Stipp et al. 2003; Hemler 2005). Es befinden sich vier bis acht Cysteinreste in der variablen Region der LEL, die durch Disulfidbrückenbindungen in Kontakt treten mit dem zu 100 % konservierten CCG-Motiv im Bereich der LEL (Stipp et al. 2003). Die kleine extrazelluläre Schleife (*small extracellular loop SEL*) besteht aus 13 bis 30 Aminosäuren und ist bei einigen Tetraspaninen glykosyliert (Stipp et al. 2003). Die evolutiv hoch konservierten hydrophoben Transmembrandomänen sind vermutlich für Wechselwirkungen zwischen Tetraspaninen untereinander von Bedeutung. So ist eine

CD151 Deletionsmutante ohne LEL immer noch mit anderen Tetraspaninen assoziiert (Berditchevski et al. 2001; Stipp et al. 2003). Dies führt zu der Annahme, dass die Transmembrandomänen für die Ausbildung von Tetraspanin-Homomeren und -Heteromeren verantwortlich sind. (Charrin et al. 2001; Hemler 2001; Stipp et al. 2003). Tetraspanine bilden zudem spezifische Bindungen zu diversen anderen Proteinen, wie Integrinen oder MHC Klasse II-Komplexen (*major histocompatibility complex class II*) (Angelisova et al. 1994; Rubinstein et al. 1994; Berditchevski et al. 1995; Berditchevski et al. 1996; Rubinstein et al. 1996). Tetraspanine sind an Signaltransduktionsprozessen beteiligt. So wurde gezeigt, dass Tetraspanine im Notch-Signalweg die enzymatische Spaltung von Notch durch die γ -Sekretase organisieren, indem sie die beteiligten Komponenten in räumliche Nähe zueinander bringen. (Wakabayashi et al. 2009; Dunn et al. 2010). Zudem binden Tetraspanine die Substrate von ADAM10 und ADAM17 und organisieren diese in unterschiedliche Membran-Mikrodomänen. Sie regulieren auf diese Weise die Spaltung des Tumornekrosefaktors α (TNF- α) und des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) durch die metallabhängigen Proteasen ADAM10/ADAM17. (Arduise et al. 2008). Des Weiteren regulieren Tetraspanine Zellfusionsprozesse. So wurde bereits gezeigt, dass das Tetraspanin CD9 essentiell für die Fusion von Oozyten und Spermien in Mammaliern ist (Chen et al. 1999; Jegou et al. 2011).

Tetraspanine können sowohl untereinander, als auch zu anderen Tetraspaninen und zu verschiedensten Interaktionspartnern innerhalb der Zellmembran Bindungen ausbilden und auf diese Weise verschiedenste Moleküle in räumliche Nähe zueinander bringen. Es bilden sich Membran-Mikrodomänen aus, so genannte *tetraspanin enriched microdomains* – TEM, die die strukturelle Basis für z.B. lokal verstärkte Signalweiterleitung darstellen (Boucheix und Rubinstein 2001; Hemler 2001; Stipp et al. 2003; Levy und Shoham 2005; Yanez-Mo et al. 2009).

Tetraspanine sind auch in intrazellulären Kompartimenten zu finden. CD63 besitzt ein lysosomales Lokalisationssignal und ist auf Lysosomen von Thrombozyten, in *Weibel-Palade-bodies* von Endothelzellen und in Granulae von neutrophilen Granulozyten zu finden (Azorsa et al. 1991; Kuijpers et al. 1991; Metzelaar und Nieuwenhuis 1991; Metzelaar et al. 1991; Vischer und Wagner 1993). Das Tetraspanin CD151 ist auf Endosomen von endothelialen Zellen lokalisiert und mit der Endozytose assoziiert (Sincock et al. 1999). Die Tetraspanine CD37, CD53, CD63, CD81 und CD82 wurden auf der inneren Membran *MHC-class II enriched compartments* (MIIC) von B-

Lymphozyten und den daraus entstandenen Exosomen, kleinen Membranvesikel, die von eukaryotischen Zellen in den Extrazellularraum sekretiert werden, nachgewiesen (Raposo et al. 1996; Escola et al. 1998; Hammond et al. 1998). CD9, CD63 und CD82 sind auch auf Exosomen von dendritischen Zellen vorhanden (Thery et al. 1999).

In der Hämatopoese wurde bereits gezeigt, dass Tetraspanine einen Einfluss auf das Entwicklungspotenzial von HSVZ ausüben. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD9 in humanen CD34⁺ Zellen, die mit SDF-1 (*stromal cell derived factor-1*) behandelt wurden, hochreguliert wird. Die Arbeit zeigte, dass die CD34⁺/CD9⁻ Zellpopulationen ein geringeres Repopulationspotential in NOD/SCID-Mäusen zeigen als CD34⁺-Zellen. Eine Neutralisierung von CD9 bei CD34⁺ Zellen mit inhibitorischen Antikörpern verminderte das Repopulationspotential dieser Zellen um 70 % (Leung et al. 2010). Eine ähnliche Beobachtung konnte mit humanen B-ALL (acute lymphoblastic leukemia) Zellen gemacht werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CD9⁺ leukämische Zellen, nicht jedoch CD9⁻ leukämische Zellen, eine Tumorgenese im Knochenmark und der in Milz von seriell transplantierten NOD/SCID/IL2γR^{null}-Mäusen induzieren (Nishida et al. 2009). Das Tetraspanin CD82 ist auf der Oberfläche von frisch isolierten humanen CD34⁺ Zellen zu 95 % exprimiert, wohingegen reifere hämatopoetische Zellen nur eine moderate Expression zeigen (Burchert et al. 1999; Tarrant et al. 2003). Die CD82-Expression ist zudem in AML (acute myeloid leukemia) - und CML (chronic myeloid leukemia) Zellen erhöht (Burchert et al. 1999). Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Behandlung von frisch isolierten CD34⁺ Zellen mit CD82 funktionsneutralisierenden Antikörpern, zu einer zweifach verminderten Repopulation dieser Zellen in NOD/SCID/IL2γR^{null}-Mäusen führte, im Vergleich zum Kontrollexperiment mit Isotyp-Antikörpern. Mit diesen Experimenten wurde nachgewiesen, dass eine funktionelle CD82 angereicherte Membrandomäne in CD34⁺ Zellen nötig ist, um eine Repopulation im Knochenmark von immundefizienten Mäusen zu gewährleisten (Larochelle et al. 2012). Es konnte gezeigt werden, dass primitive CD34⁺CD133⁺ Zellen eine stärkere CD53- sowie eine schwächere CD63-Oberflächenexpression aufweisen als die reiferen CD34⁺CD133^{low/-} Zellen (Beckmann et al. 2007). Für uns war es von Interesse, ob primitive HSVZ nach aberranter Expression von Tetraspaninen, eine veränderte Oberflächenexpression der Oberflächenantigene CD34 und CD133 aufzeigen, und somit Hinweise auf einen

Einfluss auf die Entscheidung Selbsterneuerung *versus* Differenzierung dieser Zellen geben.

1.12 Tetraspanine, Exosomen und das endosomale System

Wie bereits in Abschnitt 1.9 erwähnt, sind Tetraspanine mit dem endosomalen Kompartiment assoziiert und finden sich auch auf Exosomen. Exosomen sind kleine Membranvesikel, die von eukaryotischen Zellen in den Extrazellularraum sekretiert werden. Auch hämatopoetische Zellen sekretieren Exosomen (Escola et al. 1998). Exosomen entstehen durch eine Einstülpung der äußeren Membran von intrazellulären späten Endosomen, die als Folge dieses Vorgangs *multivesicular bodies* (MVBs) genannt werden (Ludwig und Giebel 2011). Durch eine Fusion der MVBs mit der Plasmamembran der Zelle wird ihr Inhalt in den Extrazellularraum abgegeben. Späte Endosomen und MVBs gehören zum Endosomalen System. Dieses System kontrolliert die Aufnahme und Weiterverarbeitung von Makromolekülen in Zellen, und besteht hauptsächlich aus vesikulären Zellorganellen: frühe endozytierte Vesikel, frühe Endosomen, recycling Endosomen, späte Endosomen, MVBs und Lysosomen (Scita und Di Fiore 2010). Die Produktion und Abgabe von Exosomen wird von verschiedenen Mitgliedern der Familie von Rab-Proteinen reguliert, die den Vesikeltransport zwischen spezifischen Organellen organisieren (Ostrowski et al. 2010). Rab5 sowie das *early endosome-associated antigen-1* (EEA1) sind innerhalb des endosomalen Systems auf frühen Endosomen zu finden (Mu et al. 1995; Sonnichsen et al. 2000; Rink et al. 2005), wohingegen Rab7 auf späten Endosomen lokalisiert ist (Barbero et al. 2002; Rink et al. 2005). Tetraspanine bilden Membranmikrodomänen aus, sind mit den endosomalen Kompartiment assoziiert und lassen sich auf Exosomen von hämatopoetischen Zellen nachweisen. Daher war es von Interesse, ob eine aberrante Expression ausgewählter Tetraspanine zu Veränderungen innerhalb des endosomalen Kompartiments führt, und wo die Tetraspanine innerhalb der Zelle lokalisiert sind mit Bezug auf das endosomale System. Hierfür wurden Zellen einer stromalen Zelllinie (N-KM), einer hämatopoetischen Zelllinie (THP-1) und einer Karzinomzelllinie (FaDu) mit lentiviralen Expressionskassetten transduziert, die für Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine kodieren. Diese Zellen wachsen adhärent am Boden eines Kulturgefäßes, wobei THP-1 Zellen erst nach 48-stündiger Stimulation mit phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) am Boden vom Zellkulturgefäß adhärieren. An adhärent wachsenden Zellen können intrazelluläre Kompartimente mikroskopisch detaillierter

ausgewertet werden, weil diese großflächig am Boden des Zellkulturgefäßes vorliegen, im Gegensatz zu Suspensionszellen.

1.13 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von Kandidatengenen, die nach Überexpression in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSVZ), einen Effekt auf die Dynamik der CD34⁺ und CD133⁺ Populationen ausüben. Eine veränderte Populationsdynamik ist ein Hinweis auf den Einfluss eines transduzierten Kandidatengens auf die Entscheidung zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung dieser Zellen. Es wurden primär Kandidatengene untersucht, welche in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe durch Analysen von Genexpressionsprofilen primitiver und reifer humaner hämatopoetischer Zellen, identifiziert worden sind. Für die genetische Manipulation von CD34⁺ Zellen wurde die Methode des lentiviral-vermittelten Gentransfers gewählt, um eine stabile Überexpression der Kandidatengene über einen Zeitraum von 14 Tagen zu gewährleisten. Hierfür sollen die ausgewählten Kandidatengene kloniert und in lentivirale Vektoren eingebracht werden.

Aufgrund verschiedener Vordaten aus unserer Arbeitsgruppe wurden weitere Kandidatengene in die Analysen mit einbezogen. So konnte unsere Gruppe am Beispiel human hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen zeigen, dass es eine Verbindung zwischen der asymmetrischen Zellteilung und dem endosomalen System innerhalb der untersuchten Zellen gibt. Von vier während der Zellteilung asymmetrisch segregierten Proteinen sind 3 mit dem endosomalen System assoziiert. Hierzu gehören die Tetraspanine CD53 und CD63 (Beckmann et al. 2007). Da viele aktivierte Signalwege über das endosomale System von der Zelloberfläche zum Zellkern transduziert werden, sollte dem endosomalen System eine starke Bedeutung bei dem Prozess der Selbsterneuerung von Stammzellen zugeteilt werden. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen der Überexpression der Tetraspanine CD53 und CD63 untersucht. Da Tetraspanine bezüglich ihrer sekundär- und tertiär-Strukturen hoch konserviert sind, wurde ebenso ein möglicher Einfluss weiterer Tetraspanine untersucht. Es wurden Tetraspanine gewählt, die in der CD-Nomenklatur vertreten sind. Hierzu gehören CD9, CD37 Isoform A, CD37 Isoform B, CD53s (bislang nicht beschriebene, kürzere Variante von CD53), CD81, CD82 und CD151.

Des Weiteren wurden auch die Gene *Flotillin-1* (*FLOT1*) und *Flotillin-2* (*FLOT2*) in die Untersuchungen mit eingeschlossen. Diese integralen Membranproteine sind im

Uropoden von migrierenden primitiven hämatopoetischen Zellen nachweisbar, und mit Polarisierungsprozessen von HSVZ assoziiert (Rajendran et al. 2009; Görgens et al. 2012). Sie haben, ebenso wie Tetraspanine, membranorganisierende Eigenschaften und sind vor allem in „*Lipid rafts*“ zu finden (Salzer und Prohaska 2001). Daher war es von Interesse, ob eine Überexpression dieser Gene ebenfalls einen Effekt auf die Entwicklung von HSVZ ausübt.

Aufgrund der Tatsache, dass die Tetraspanine CD53 und CD63 in sich teilenden HSVZ asymmetrisch verteilt werden, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob CD53 und CD63, sowie die Tetraspanine CD9, CD37a, CD37b, CD53s, CD81, CD82 und CD151, sich als molekularbiologische Werkzeuge zur Analyse asymmetrischer Zellteilungen in HSVZ eignen. Zu diesem Zweck wurden Tetraspanin-Fusionskonstrukte konzipiert, mit deren Hilfe aus FaDu, NK-M und THP-1 Zellen Zelllinien hergestellt wurden, die stabil Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine exprimieren. An diesen Zelllinien wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt und die subzelluläre Lokalisation der exprimierten Tetraspanin-Fusionsproteine mit Bezug zu den angefärbten endosomalen Kompartimenten analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Blotkammer	X-cell Sure Lock	Biorad
Brutschrank	HERAcell 240i	Thermo Scientific
Durchflusszytometer	FC-500	Beckman-Coulter
Durchflusszytometer	Aria I	BD Biosciences
Einfrierhilfe	Typ 5100	Nalgene
Feinwaage	MP-300	Citizen
Gefäßschüttler	Vortex MS-3 basic	IKA-Jahnke & Kunkel
Geldokumentationsanlage	Fusion FX-7	Vilber Lourmat
Geldokumentationsanlage	red	Alpha Innotek
Gelelektrophoresekammer	4012-14	Peqlab
Gelelektrophoresekammer	SE-250	Hoefer
Gelständer	Mutiple Gel Caster	Hoefer
Hämatologie-Analysator	KX 21N	Sysmex
Heizblock	HX-2	Peqlab
Inkubationsschüttler	MaxQ 6000	Thermo Scientific
Kühlschrank	FKS 2600	Liebherr
Kühlzentrifuge	Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific
Magnetheizrührer	MR 3002	Heidolph
Mikroskop	Axio Observer Z1	Zeiss
Mikroskop Zellkultur	Axio Vert A1	Zeiss
Mikrowelle	HF15G541	Siemens
Netzteil	FB300	Thermo Scientific
Photometer	Nanodrop 2000	Thermo Scientific
Pipetten	P2, P10, P20, P200, P1000	Gilson
Pipettierhilfe	Pepetboy accu-jet Pro	Brand
Reinstwasseranlage	Q-Gard 2	Millipore
Sterilbank	Hera KS-12	Kendro
Taumler	Typ VX7	Janke & Kunkel
Thermocycler	GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
Tiefkühlschrank	GNP 2076	Liebherr
Wasserbad	1008	GFL
Zellzählkammer	Neubauer Improved	LO Laboroptik
Zentrifuge	5810 R	Eppendorf
Zentrifuge	5424	Eppendorf
Zentrifuge	Avanti J-26 XP	Beckman-Coulter

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Zusatzbezeichnung	Hersteller
24-Well plate	Suspensionskultur	Greiner
24-Well plate	TC-Treated, flat bottom	Corning
6-Well plate	TC-Treated, flat bottom	Greiner
8-tube Strip + caps	0,2 µl MicroAmp™	AB Applied Biosystems
Aufsatzfilter 0,22 µm	Bottle-Top Filter 250 ml	TPP
Aufsatzfilter 0,22 µm	Bottle-Top Filter 500 ml	TPP
Blutbeutel	MSC 1201 DU	MacoPharma
Chromatographiepapier	3MM-CHR	Whatmann International
Deckgläschen 13 mm	Menzel-Gläser	Thermo Scientific
Einmalspritzen	LuerLock 20 ml	Omnifix
Einmalspritzen	Discardit	BD Biosciences
Glasflaschen	diverse Größen	Schott
Kryo-Gefäße	Cryo.S	Greiner
MACS Separationssäulen	LS-Column	Miltenyi Biotec
Nitril- Handschuhe	Peha soft	Hartmann
Pasteur Pipetten	Glas	Brand
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson
Polypropylen-Röhrchen	14 ml, 50 ml	BD Biosciences
Polypropylen-Röhrchen	5 ml Rundboden	BD Biosciences
PVDF-Membran	Immobilon-P	Millipore
Reaktionsgefäße	1,5 ml; 2 ml	Eppendorf
Spritzenfilter	Minisart 0,22 µm	Sartorius
Spritzenfilter	Minisart 0,45 µm	Sartorius
Stabpipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner
Verschlussfolie	Parafilm M	Pechiney
Zellkulturflaschen	T25, T75, T175	Greiner
Zellsieb	40 µm Porengröße	Partec
Zentrifugationsröhrchen	40 ml	Nalgene

2.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-Propanol/Isopropanol	Sigma-Aldrich
Acrylamid Mix 30 %	Biorad
Agar-Agar	BD Biosciences
Agarose	Lonza
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Roth
Biocoll Separating Solution	Biochrom
Bromphenolblau	Roth
BSA	Roth
Buttersäurenatriumsalz	Merck

didesoxynukleotide (dNTPs)	Fermentas
DMSO	WAK-Chemie
DPBS	Gibco
EDTA	Sigma-Aldrich
Eindeckelmedium Vectashield	Vector
Ethanol; pro analysi	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid-Lösung	Inno-Train
Formaldehyd	Merck
Fötales Rinderserum (FBS)	Biochrom
Hefe-Extrakt	BD Biosciences
IPTG	Roth
Kanamycin	Roth
Lithiumchlorid	Riedel-de Haën
Lysepuffer (Erythrozytenlyse)	BD Biosciences
Lysozym	AppliChem
Magnesiumchlorid	Merck
Mangan-II-chlorid	Roth
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Methanol, pro analysis	Sigma-Aldrich
Milchpulver	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Sigma-Aldrich
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Biorad
Natronlauge	Merck
Nonidet P40 (NP-40)	Sigma-Aldrich
Normal Donkey Serum	Jackson Immuno Research
Normal Goat Serum	Jackson Immuno Research
Nukleasefreies Wasser	Ambion
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
PBS	Gibco
phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich
Propidiomiodid	Baack Labor
PSG- Pen./Strep./L-Glut.(Zellkultur)	Gibco
Retronektin	Takahara
Rnase A	AppliChem
Temed	Invitrogen
Tris-Base	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Gibco
Trypsin	Sigma-Aldrich

Tween20	Merck
X-Galactosidase (X-Gal)	Roth
Xylol	Roth

2.1.4 Medien und Medienzusätze

Medium für FaDu-Zellen

RPMI1640 von PAA
10% FBS
100 U/ml Penicillin/Streptomycin
100 U/ml L-Glutamin

Medium für HEK293T-Zellen

DMEM (4,5 g/l Glucose) von PAA
10% FBS
100 U/ml Penicillin/Streptomycin
100 U/ml L-Glutamin

Medium für N-KM-Zellen

IMDM von Lonza
10% FBS
100 U/ml Penicillin/Streptomycin
100 U/ml L-Glutamin

Medium für THP1-Zellen

RPMI1640 von PAA
10% FBS
100 U/ml Penicillin/Streptomycin
100 U/ml L-Glutamin

Medium für CD34⁺-Zellen

IMDM von Lonza
20% FBS
100 U/ml Penicillin/Streptomycin
100 U/ml L-Glutamin
10 ng/ml FLT3L, SCF, TPO

2.1.5 Puffer und Lösungen

Puffer /Lösungen	Zusammensetzung
5x SDS-Probenpuffer	60 mM Tris-Cl, pH 6,8; 2% (w/v) SDS; 10% Glycerol; 5% Betamercaptoethanol; 0,01% Bromphenolblau
Paraformaldehydlösung	8% PFA in PBS; pH 7,4
LB-Medium	1% (w/v) Bactotrypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; pH 7,4
Lysepuffer	0,83% Ammoniumchlorid in ddH ₂ O
MACS-Puffer	0,1% BSA; 2 nM EDTA in PBS
PBST/Waschpuffer	PBS; 0,1% Tween20
TAE-Puffer	40 mM Tris/Essigsäure; pH 8,3; 1 mM EDTA
TELT-Puffer	1 M Tris pH 8,0; 0,5 M EDTA pH 8,0; 10% Triton X-100; 3,2 M LiCl; 50 mg/ml Lysozym und 20 mg/ml RNase A
TFB1	30 mM Kaliumacetat; pH 7,5 (Essigsäure); 50 mM MnCl ₂ ; 100 mM RbCl ₂ ; 10 mM CaCl ₂ ; 15% (v/v) Glycerin
TFB2	10 mM MOPS; pH 7,0 (NaOH); 75 mM CaCl ₂ ; 10 mM RbCl ₂ ; 15% (v/v) Glycerin
Transferpuffer	25mM TrisBase; 150 mM Glycin; 20% Methanol; pH 8,3
SDS-Elektrophorese Puffer	25 mM TrisBase; 250 mM Glycin; 0,1% SDS; pH 8,3

2.1.6 Molekularbiologische Reaktionssysteme/Kits

Bezeichnung	Hersteller
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce
Flow-Count <i>Fluorospheres</i>	Beckman-Coulter
Immobilon Western HRP Substrate	Millipore
MBC CD34 Micro Bead Kit human	Mitenyi Biotec
Plasmid Plus Maxi Kit	Qiagen
RNeasy Kit	Qiagen
SuperScript II	Invitrogen
T4-Ligation Kit	Fermentas

2.1.7 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce
Flow-Count <i>Fluorospheres</i>	Beckman-Coulter
Immobilon Western HRP Substrate	Millipore
MBC CD34 Micro Bead Kit human	Mitenyi Biotec
Plasmid Plus Maxi Kit	Qiagen
RNeasy Kit	Qiagen
SuperScript II	Invitrogen
T4-Ligation Kit	Fermentas
Wizard SV Gel & PCR Clean-Up System	Promega

2.1.8 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von Invitrogen (Darmstadt) bzw. Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert.

Tab. 2.1: Für PCR-Amplifikationen verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
ARNTL2 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGGCGGCGGAAGAGGAGG
ARNTL2 cloning 3'	CTATTGGGATCCCTAGAGGGTCCACTGGATG
ARNTLA cloning 5' A	TCAAACTCGAGGCCACCATGGCAGACCAGAGAATGGAC
ARNTLA cloning 3'	CTATTGGGATCCTTACAGCGGCCATGGCAAG
ARNTLB cloning 5' B	TCAAACTCGAGGCCACCATGATTAATATAGAAAGCATG
ARNTLB cloning 3'	CTATTGGGATCCTTACAGCGGCCATGGCAAG
BHLHB2 cloning 5'	TCAACAGTCGACGCCACCATGGAGCGGATCCCCAGCGCG
BHLHB2 cloning 3'	CTATTGGAATTCTTAGTCTTTGGTTTCTAAGTTTAAAG
CEBPD cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGAGCGCCGCGCTCTTCAGC
CEBPD cloning 3'	CTATTGGGATCCTTACCGGCAGTCTGCTGTCCCGG
ELF1 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGGCTGCTGTTGTCCAACAG
ELF1 cloning 3'	CTATTGGCTAGCCTAAAAAGAGTTGGGTTCC
FOXP1A cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGATGCAAGAATCTGGGAC
FOXP1A cloning 3' A	CTATTGGGATCCTCACTCCATGTCCTCGTTTAC
FOXP1B cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGATGCAAGAATCTGGGAC
FOXP1B cloning 3' B	CTATTGGGATCCTCAAAATGGGGAAGGGTTAGG
FUS cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGGCCTCAAACGATTATACCC
FUS cloning 3'	CTATTGGGATCCTTAATACGGCCTCTCCCTGCG
HOXA5 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGAGCTCTTATTTTGTAAC
HOXA5 cloning 3'	CTATTGGGATCCTCAGGGACGGAAGGCCCTCC
ID3 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGAAGGCGCTGAGCCCGGTG
ID3 cloning 3'	CTATTGGGATCCTCAGTGGCAAAGCTCCTTTTG
ID4 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGAAGGCGGTGAGCCCGGTG
ID4 cloning 3'	CTATTGGGATCCTCAGCGGCACAGAATGCTG
KLF10 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGCTCAACTTCGGTGCCTC
KLF10 cloning 3'	CTATTGGGATCCTCACTGTGTGGGAGCAGGGG
KLF11 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGCACACGCCGGAATTCGC
KLF11 cloning 3'	CTATTGGGATCCTCAGGCAGAGGCTGGCATGC
KLF2 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGGCGCTGAGTGAACCCATC
KLF2 cloning 3'	CTATTGGGATCCCTACATGTGCCGTTTCATGTG
KLF6 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGGACGTGCTCCCATGTGC
KLF6 cloning 3'	CTATTGGGATCCTCAGAGGTGCCTCTTCATGTGC
KLF9 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGTCCGCGGCCGCCTACATG
KLF9 cloning 3'	CTATTGGAATTCTCACAAGCGTTGGCCAGCG
LMO4 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGGTGAATCCGGGCAGCAGC
LMO4 cloning 3'	CTATTGGGATCCTTAGCAGACCTTCTGGTCTGG
MEOX2 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGGAACACCCGCTCTTTGG
MEOX2 cloning 3'	CTATTGGGATCCTCATAAGTGCGCATGCTCTG
NFIB cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGATGTATTCTCCCATCTGTC

NFIB cloning 3'	CTATTGGGATCCCTAGCCCAGGTACCAGGAC
SIX1 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGTCTGATGCTGCCGTCG
SIX1 cloning 3'	CTATTGGGATCCTTAGGACCCCAAGTCCACC
SMAD3 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGTCTGATCCTGCCTTTC
SMAD3 cloning 3'	CTATTGGGATCCCTAAGACACACTGGAACAG
SNAI2 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGCCGCGCTCCTTCCTGGTC
SNAI2 cloning 3'	CTATTGGGATCCTCAGTGTGCTACACAGCAGC
SOX11 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGGTGCAGCAGGCGGAGAG
SOX11 cloning 3'	CTATTGGGATCCTCAATATGTGAACACCAGG
SOX4 cloning 5'	TCAACAGTCGACGCCACCATGGTGCAGCAAACCAAC
SOX4 cloning 3'	CTATTGGAATTCTCAGTAGGTGAAAACCAGG
SOX9 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGAATCTCCTGGACCCCTTC
SOX9 cloning 3'	CTATTGGGATCCTCAAGGTCGAGTGAGCTGTG
TCF19 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGCTGCCCTGCTTCCAACCTGC
TCF19 cloning 3'	CTATTGAGATCTTTAGGTCTGAATGCCAGCCCG
ZNF85 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGGGACCATTGACATTTAGGG
ZNF85 cloning 3'	CTATTGGGATCCTCATATTTGTAATTTTCTCC
ZNF281 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGAAAATCGGCAGTGGGTTC
ZNF281 cloning 3'	CTATTGAGATCTTTACCTGTAACCTCTGGCTGG
ZNF367 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGATCCGGGGCTTCGAGGCG
ZNF367 cloning 3'	CTATTGGGATCCCTACTGTCTGGAGTGGCG
ZNF395 cloning 5'	TCAAACTCGAGGCCACCATGGCGAGTGTCTGTCCCG
ZNF395 cloning 3'	CTATTGGGATCCTCAGTCCAGAAAGCGCTGGC
CD9 cloning 5'	TCAACCTCGAGGCCACCATGCCGGTCAAAGGAGGCAC
CD37 cloning 5' A'	TCAACGTCGACGCCACCATGTCAGCCAGGAGAGCTG
CD37 cloning 5' B	TCAACGTCGACGCCACCATGGGCATCGCCCTCCTGGG
CD53 cloning 5' fusion	ATACCCGATCCGCCCTATGGTCTGGCTGGT
CD63 cloning 5'	ACCGATCTCGAGCAATGGCGGTGGAAGGAGGAATG
CD81 cloning 5'	TCAACCTCGAGGCCACCATGGGAGTGGAGGGCTGCAC
CD82 cloning 5'	TCAACCTCGAGGCCACCATGGGCTCAGCCTGTATCAAAG
CD151 cloning 5'	TCAACCTCGAGGCCACCATGGGTGAGTTCAACGAGAAG
CD9 cloning 3' stop	CTATTGAATTCCTAGACCATCTCGCGGTTCC
CD37 cloning 3' stop	CTATTGAATTCGCGGCCCGCTAACGGTATCGAGCGAGCC
CD53 cloning 3' stop	CTATTGGGATCCTCATAGCCCTATGGTCTGG
CD63 cloning 3' stop	ACCGATGAATTCCTACATCACCTCGTAGCCACTTCT
CD81 cloning 3' stop	CTATTGAATTCCTCAGTACACGGAGCTGTTCC
CD82 cloning 3' stop	CTATTGAATTCGCGGCCGCTCAGTACTTGGGGACCTTGC
CD151 cloning 3' stop	CTATTGAATTCCTCAGTAGTGCTCCAGCTTGAG
CD9 cloning 3' fusion	CTATTGAATTCGGACCATCTCGCGGTTCTCTGC
CD37 cloning 3' fusion	CTATTGAATTCGACGGTATCGAGCGAGCCGG
CD53 cloning 3' fusion	ATACCCGATCCGCCCTATGGTCTGGCTGGT
CD63 cloning 3' fusion	ACCGATGAATTCCTCACCTCGTAGCCACTTCTGATACT
CD81 cloning 3' fusion	CTATTGAATTCGGTACACGGAGCTGTTCCGG
CD82 cloning 3' fusion	CTATTGAATTCGGTACTTGGGGACCTTGCTG
CD151 cloning 3' fusion	CTATTGAATTCGGTAGTGCTCCAGCTTGAGAC

Tab. 2.2: Für Sequenzierungsreaktionen verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
PR2 Sequencing	GGCCAAACAGGATATCTGCG
GFP rev Sequencing	AGGGTCAGCTTGCCGTAGGT
IRES Seq +44	AACGCACACCGGCCTTATTCC
ARNLT2 fwdseq1	CGCGTAAACTGGACAACTTACAG
ARNLT2 fwdseq2	GCATGGATGCTTACCCAACTC
ARNLT2 revseq1	TTCTCCAGGCTCACTATGTCCC
ARNTLA fwdseq	AAGCATGGACACAGACAAAGATGAC
ARNTLA revseq	GGACTACTTGATCCTTGGTCGTTG
ARNTLB fwdseq	CTGTGCTAAGGATGGCTGTTCA
ARNTLB revseq	CTTCCAGGACGTTGGCTAAAAC
CEBPD fwdseq1	AGCGCAACAACATCGCCGT
ELF1 fwdseq1	CCCTATGCTGGATGAAAAACGAA
ELF1 revseq1	GATGGATCTGTGCTGGCTATAAC
ELF1 seqfwd	CGACCAGATTCCCCAGCCACT
FLOT1 fwdseq1	TCCCCATCTCAGTCACTGGCATT
FLOT2 fwdseq1	GAGATCCTCAGCTTCACCATCAAG
FLOT2 revseq1	CCATCGCCTCGATGACTGC
FOXP1A fwdseq1	CCTCATGCTTCAACAGCAGCAGC
FOXP1A revseq	GAGATTCGAGAATGGCCTGCC
FUS fwdseq1	AGCTATGGACAGCAGCAAAGC
FUS revseq1	GAGACCGTTGCCTCTCCCTTC
KLF10a fwdseq1	GCTCAGGCAACAAGTGTGATTTCG
KLF10a revseq1	CTTTGAACTCTGCACAACGGGC
KLF11 fwdseq1	TCCAAAGCATGTACAGCCACGG
KLF4 fwdseq1	CAGCTTCACCTATCCGATCCG
MEOX2 fwdseq1	AGCGACAGCTCAGACTCCCA
MLLT3 fwdseq1	CAACCCACAGAGGACTTTAGGAG
MLLT3 fwdseq2	TCAACAACCCACAGAGGAC
MLLT3 revseq1	CCTGGAAGGTTCTTTGAAGGCA
NFIB Fwdseq	CAAGAAGCACCCGTGCTGTG
Prox1 fwdseq1	CAGTGTGGCATTAAAGGGGCA
Prox1 revseq1	GCTGAGAGGTAATGCATCTGTTGAA
SMAD3 fwdseq1	TTGCAGGTGTCCCATCGGAA
SMAD3 seqfwd	CGAGCTACGGGCCATGGAG
SOX11 fwdseq1	AGAGCCCAGAGAAGAGCGCG
SOX4 fwdseq1	GGCCCAGGAAGAAGGTGAA
SOX4 revseq1	GGAAGAGGAGGAGTGGGACGA
SOX9 fwdseq1	AGACTTCTGAACGAGAGCGAGAAG
ZNF281 fwdseq1	AGGAGCAGCAGTCCCACCACC
ZNF281 fwdseq2	CATATGGAGAGACACAAGAGGACAC
ZNF281 revseq1	GCCTGTTGGAGGTATTTGGAG
ZNF367 fwdseq1	GCACACAACGTGACGCTCAG
ZNF395 fwdseq1	TGGTGCTGACGTCCCTGTCCT

ZNF85 fwdseq1	GGCATGATTTTCATGCCTAACTGA
ZNF85 fwdseq1	GGCAAATCATTGTCATGATTTC
ZNF85 fwdseq2	ACCCTACAAATGTGAAAAATGTGG
ZNF85 fwdseq3	CCATACAAATGTGAAGAATGTGGC
ZNF85 revseq1	CACATTCATAGGGTTTCTCTCCAGTAT

2.1.9 Antikörper

Tab. 2.3: Verwendete konjugierte Antikörper.

Spezifität	Konjugat	Klon	Herkunft	Hersteller
Isotyp Kontrolle	FITC	MOPC-21	Maus	BD Biosciences
Isotyp Kontrolle	PE	MOPC-21	Maus	BD Biosciences
human CD133	PE	AC133	Maus	Miltenyi Biotec
human CD151	PE	14A2.H1	Maus	BD Biosciences
human CD19	ECD	LT-19	Maus	Beckman Coulter
human CD34	ECD	581	Maus	Beckman Coulter
human CD37	FITC	NMN 46	Maus	EuroBioSciences
human CD37	PE	424925	Maus	R&D Systems
human CD38	FITC	HIT2	Maus	BD Biosciences
human CD45RA	PeCy7	HI100	Maus	BioLegend
human CD4	PE	RPA-T4	Maus	BD Biosciences
human CD53	FITC	HI29	Maus	BD Biosciences
human CD53	PE	MEM-53	Maus	EXBIO
human CD63	FITC	H5C6	Maus	BD Biosciences
human CD63	PE	MEM-259	Maus	EXBIO
human CD81	FITC	5A6	Maus	BioLegend
human CD81	PE	JS-81	Maus	BD Biosciences
human CD82	PE	ASL-24	Maus	BioLegend
human CD8	FITC	HIT8a	Maus	BD Biosciences
human CD9	FITC	HI9a	Maus	BioLegend
human CD9	PE	HI9a	Maus	BioLegend

Tab. 2.4: Verwendete unkonjugierte Antikörper.

Spezifität	Klon	Anwendung/ Verdünnung	Herkunft	Hersteller
human CD9	VJ1/20	WB 1:500	Maus	*(Penas et al. 2000).
human CD37	2B8	WB 1:500	Maus	abcam
human CD53	MEM-53	WB 1:200	Maus	EXBIO
human CD63	H5C6	WB 1:1000	Maus	BD Biosciences
human CD81	JS-81	WB 1:1000	Maus	BD Biosciences
human CD82	EPR4112	WB 1:1000	Kaninchen	abcam
human CD151	50-6	WB 1:200	Maus	BioLegend
human CD9	VJ1/20	ICC 1:100	Maus	*(Penas et al. 2000).
human CD53	HI29	ICC 1:50	Maus	BD Biosciences

human CD63	H5C6	ICC 1:300	Maus	BD Biosciences
human CD81	JS-81	ICC 1:100	Maus	BD Biosciences
human CD29	MAR4	ICC 1:40	Maus	BD Biosciences
human CD44	J.173	ICC 1:30	Maus	Beckman Coulter
human EEA1	14/EEA1	ICC 1:300	Maus	BD Biosciences
human Rab5	1/Rab5	ICC 1:100	Maus	BD Biosciences
human Rab7	D95F2	ICC 1:100	Kaninchen	Cell Signalling
β -Tubulin	9F3	ICC 1:250	Kaninchen	Cell Signalling
β -Actin	AC-15	ICC 1:3000	Maus	Sigma-Aldrich

* Der CD9-Antikörper wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Sánchez-Madrid (Departments of Dermatology and Immunology, Hospital Universitario de La Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Spain) zur Verfügung gestellt. (WB: western Blot; ICC: Immuncytochemie)

Tab. 2.5: Verwendete Sekundärantikörper.

Spezifität	Anwendung/Verdünnung	Hersteller
donkey anti mouse-Cy3	ICC -intra 1:800 ICC -extra 1:300	Dianova
goat anti rabbit-Cy3	ICC -intra 1:600 ICC -extra 1:300	Dianova
donkey anti mouse-HRP	WB 1:10.000	Dianova
donkey anti rabbit-HRP	WB 1:10.000	Dianova

(WB: western Blot; ICC: Immuncytochemie)

2.1.10 Plasmide

Tab. 2.6: Charakterisierung der verwendeten Plasmide.

Plasmid	Charakterisierung	Herkunft
pEGFP-N1	CMV-Prom; EGFP; SV40 pA; f1 ori; SV40 ori; Kan ^r /Neo ^r ; HSVtkpA, pUC ori	Clontech
pIRES-EGFP	CMV-Prom; MCS; IVS; IRES (ECMV); eGFP; BGH p; ColE1 ori; Amp ^r	AG Giebel
pBSK ⁺	T7-Prom; T3-Prom; f1+ ori; lac-Prom, lacZ', MCS; pUC ori; Amp ^r	Clontech
pCL6IEGwo	CMV-Prom; SV40 ori; ColE1, IRES; eGFP; SFFV-Prom; BGH p; RRE; cPPT; Amp ^r	AG Hanenberg*
pCD/NL-BH	CMV-Prom; Gag; Pol; Vif; Vpr, Rev; Tat1; Vpu; Δ env; Tat2; Δ nef; BGH pA; Coll; Amp ^r	AG Hanenberg*
pcoPE01	CMV-Prom; Exon1 SD; Intron; Exon2 SA; PFV wt env; BGH pA; f1 ori; SV40 Prom; SV40 pA, ColE1; Amp ^r	AG Hanenberg*

*: die zur genetischen Manipulation verwendeten Plasmide basieren auf einem adaptierten lentiviralen 3-Plasmidsystem von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Helmut Hanenberg (Hals-Nasen-Ohrenklinik, Universitätsklinikum Düsseldorf). Darstellungen der Plasmide befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

2.1.11 Plasmide zur Herstellung virushaltiger Überstände

Retroviren können mit Hilfe ihrer reversen Transkriptase ihr RNA-Genom in DNA umschreiben, um diese in das Wirtsgenom zu integrieren. Die integrierte DNA wird bei jeder Zellteilung repliziert und mit der Wirts-DNA auf die Tochterzellen verteilt. Dieser Prozess ermöglicht eine stabile Transduktion und aberante Expression von Genen in eukaryotischen Zellen (Baltimore 1970; Temin und Mizutani 1970).

Das zur Herstellung virushaltiger Zellkulturüberstände verwendete Plasmid *pCL6IEGwo* kodiert für retrovirale Strukturproteine, die auf dem zur Familie der Retroviren gehörenden Lentivirus HIV (humanes immundefizienzvirus) basieren. Er ist aufgrund seines Aufbaus ein *self-inactivating* (SIN) Vektor, bei dem der Promoter- und Enhancer-Bereich im 3'LTR deletiert ist. Der defekte U3-Bereich des 3'LTR wird bei der Integration in das Genom der Zielzelle auf den U3-Bereich des 5'LTR geschrieben, wodurch diese LTRs transkriptionell stumm sind (Leurs et al. 2003). Die kodierenden Sequenzen der viralen Strukturgene wie *gag*, *pol* und *env* sind auf weitere Expressionvektoren verteilt (s.u.). Die transiente Transkription des Vektorplasmids wird von dem *intermediate early* Promoter des *Human Cytomegalovirus* (CMV-Promoter) reguliert. Zusätzlich trägt das Vektorplasmid einen internen Promoter, von dem aus die diversen Expressionskassetten (entweder bestehend aus dem Gen von Interesse (*gene of interest* - GOI), die *Internal Ribosomal Entry Site* (IRES) und dem *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) oder einem GOI-eGFP-Fusionsproteins) transkriptionell gesteuert werden. Dieser Promoter stammt aus dem *Spleen Focus Forming Virus* (SFFV). Der Vektor trägt zudem noch eine *multiple cloning site* (MCS), die es erlaubt, ein Gen von Interesse vor die IRES-eGFP-Kassette einzufügen. Die IRES Sequenz vermittelt nach der Transkription einer bicistronischen mRNA die Translation von zwei separaten Proteinen (Jang et al. 1988; Pelletier und Sonenberg 1988; Macejak und Sarnow 1991).

Für die Herstellung rekombinanter replikationsdefekter Retroviren wurden weitere Sequenzen, die für virale Strukturproteine kodieren, von separaten Expressionsplasmiden zur kodiert. Diese Plasmide werden als Helfer- und Hüllplasmide bezeichnet, und ihre separat bereitgestellten Genprodukte werden aufgrund des deletierten Verpackungssignals ψ nicht in virale Partikel inkorporiert. Das Helferplasmid

pCD/NL-BH kodiert für die lentiviralen Strukturgene *gag* und *pol* sowie für die regulatorischen Gene *vif*, *vpr*, *vpu*, *rev* und *tat* unter der Kontrolle des CMV-Promotors (Mochizuki et al. 1998)

Das Hüllplasmid *pcoPE01* kodiert für das foamyvirale (*primate/prototyp foamy virus*) Hüllprotein, dessen Expression ebenfalls vom CMV-Promoter reguliert wird (Heinkelein et al. 1998). Durch die Pseudotypisierung kann der Tropismus der viralen Partikel geändert werden, so dass im Vergleich zu klassisch verwendeten Hüllproteinen (z.B. das Glycoprotein G des *vesicular stomatitis virus*, VSV-G), ein größeres Wirtsspektrum erreicht wird (Meiering und Linial 2001). Ein weiterer Vorteil des foamyviralen Hüllproteins ist eine potenziell hohe Kapazität große heterologe Sequenzen zu verpacken (Heinkelein et al. 1998).

Eine simultane transiente Transfektion mit den oben beschriebenen Plasmiden führt zur Generierung von replikationsdefekten retroviralen Partikel durch die transfizierten eukaryotischen Zellen (Soneoka et al. 1995; Naviaux et al. 1996).

2.1.12 Zellen und Zelllinien

FaDu

FaDu-Zellen sind humane epitheliale Zellen, die aus einem Plattenepithelkarzinom aus dem Hypopharynx eines Patienten aus Kalkutta, Indien, isoliert worden sind (Rangan 1972). Die adhärent wachsenden Zellen werden in RPMI1640 10% FBS, 1% Pen/Strep kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen trypsiniert und 1:10 gesplittet.

HEK293T

HEK293T-Zellen sind von der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 abgeleitet. Sie sind mit dem Adenovirus Type 5 immortalisiert worden (Graham et al. 1977). HEK293T-Zellen exprimieren das large-tumor Antigen des Simian Virus 40 (SV40, was die Replikation von episomalen Plasmiden mit SV40-ori ermöglicht (DuBridge et al. 1987). Die adhärent wachsenden Zellen werden in DMEM 10% FBS, 1% Pen/Strep kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen trypsiniert und 1:10 gesplittet.

N-KM

N-KM-Zellen sind mesenchymale Stammzellen (*mesenchymal stem cells*, MSC) aus dem Knochenmark anonymisierter Probanden. Die N-KM Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Bertram Opalka (Klinik für Hämatologie, Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt. Die adhärent wachsenden Zellen werden in IMDM 10% FBS, 1% Pen/Strep kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen trypsiniert und 1:20 gesplittet.

THP1

THP1-Zellen wurden aus dem Blut eines an akuter monozytärer Leukämie erkrankten einjährigen Jungen isoliert. Sie weisen Merkmale von Monozyten auf, wie zum Beispiel die Fähigkeit zur Phagozytose und die Produktion von Lysozymen. Die Zellen wachsen in Suspension und bilden zum Teil lockere Anhäufungen. Durch Behandlung mit Phorbolestern differenzieren sie zu Makrophagen-ähnlichen Zellen und werden adhärent (Tsuchiya et al. 1980; Tsuchiya et al. 1982). Die in Suspension wachsenden Zellen werden bei einer Dichte von $1 \times 10^6/\text{ml}$ 1:10 gesplittet. THP1-Zellen werden in RPMI1640 10% FBS, 1% Pen/Strep kultiviert. Nach Zugabe von Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) zu einer Endkonzentration von 100 ng/ml, werden die Zellen innerhalb von 48 Stunden adhärent.

Primärzellen

Alle Versuche mit humanem Zellmaterial wurden mit Genehmigung der Ethikkommissionen der Universitätskliniken Düsseldorf bzw. Essen durchgeführt.

Die Abnahme von Nabelschnurrestblut am Universitätsklinikum Essen erfolgte in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Leitung Prof. Dr. Rainer Kimmig, nach Zustimmung der Mütter.

2.1.13 Computerprogramme

Program	Verwendung
Adobe Photoshop CS2	Bildbearbeitung
Axiovision Rel 4.8	Digitale Photographie
CXP 2.2	Auswertung Durchflusszytmetrie
Endnote	Literaturdatenbank
FUSION-CAPT	Auswertung/ AK-Detektion
Geneious	virtuelle Klonierung/Sequenzanalysen
Graph Pad Prism 3	Auswertung, Erstellung der Graphiken

Mozilla Firefox	Internetrecherche
Windows Excel	Auswertung
Windows XP	Betriebssystem

2.1.14 Statistik

Alle metrischen Werte wurden als arithmetisches Mittel mit dem Standardfehler des Mittelwertes (*Standard Error of the Mean* \pm *SEM*) angegeben. Zur Berechnung der Signifikanz wurde der zweiseitig gepaarte Students T-Test angewendet.

2.2 Methoden der Zellkultur

2.2.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zur längeren Aufbewahrung von Zellen wurden diese mit PBS gewaschen, ggf. trypsinisiert und pelletiert. Das Pellet wurde in frischem Medium resuspendiert und anschließend mit einem Volumen Einfriermedium (80% FBS, 20% DMSO) vermischt (Endkonzentration DMSO 10%). Die Zellsuspension wurde in 2 ml Einfriergefäßen mit Gewinde und Schraubdeckel überführt und mit Einfrierhilfen, die eine konstante Temperatursenkung von 1°C/min gewährleisten, bei -80°C eingefroren. Für eine längerfristige Lagerung wurden die Gefäße mit der gefrorenen Zellsuspension bei -196°C gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Einfriergefäße schnell bei 37°C aufgetaut und die Zellsuspension in ein 14 ml Gefäß mit 10 ml vorgewärmtem Kulturmedium überführt. Die Zellen wurden für 5 min bei 900 x g pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in frischem Kulturmedium resuspendiert und wieder in Kultur genommen. Am nächsten Tag wurde abermals das Kulturmedium gewechselt, um tote Zellen aus der Kultur zu entfernen.

2.2.2 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen bzw. Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

2.2.3 Isolation von mononukleären Zellen aus Nabelschnurrestblut

Um in einem späteren Schritt effektiv CD34⁺ Zellen anzureichern, wurden zunächst die mononukleären Zellen (MNZ) von den restlichen Blutbestandteilen des Nabelschnurrestblutes getrennt. Zur Dokumentation wurden Gesamtvolumen, Abnahmezeit und Datum protokolliert. In einem 50 ml Gefäß wurden 15 ml Ficoll-Lösung (Dichte 1,077 g/ml) mit 35 ml Blut überschichtet. Das Gefäß wurde für 20 min

bei 900 x g einer Dichtezentrifugation ohne Bremse unterzogen. Nach der Dichtezentrifugation waren in dem Gefäß verschiedene Phasen sichtbar. Die oberste Phase beinhaltet die Plasmaphase des Blutes, in der sich auch Thrombozyten befinden. Darunter folgt die Interphase, welche die MNZ enthält. Es folgt eine klare Ficollphase. Unter der Ficollphase befinden sich die Erythrozyten und Granulozyten, die eine höhere Dichte als die Ficolllösung besitzen. Die oberste Plasmaphase wurde mit einer Stabpipette bis ca. einen Zentimeter über der Interphase abgenommen und verworfen. Durch die Zentrifugation bildeten sich kleine Ablagerungen der Interphase an der Gefäßwand. Durch leichtes Kratzen an der Gefäßwand auf der Interphasenhöhe wurden diese Ablagerungen abgelöst und zusätzlich mit aufgenommen. Mit kreisenden Bewegungen einer Stabpipette wurde nun die Interphase abgenommen und in ein neues 50 ml Gefäß überführt. Das Gefäß mit den restlichen Blutbestandteilen wurde verworfen. Für das Volumen von einem Blut waren meist zwei bis drei 50 ml Gefäße für die Dichtezentrifugation nötig. Die Interphasen von einem Blut wurden in einem neuen Gefäß zusammengeführt. Die Interphasen wurden auf 50 ml mit PBS aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 650 x g. Hierbei sedimentieren die MNZ, wohingegen Reste von Blutplättchen in Lösung bleiben. Mit einer Stabpipette wurde nach der Zentrifugation der Überstand bis auf ca. 1 ml entfernt und verworfen. Die sedimentierten MNZ wurden in PBS resuspendiert. Das Gefäß wurde nun auf 20 ml mit Ammoniumchlorid (Lysepuffer) zur Erythrozytenlyse aufgefüllt und 7 min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Gefäß zum Abstoppen der Reaktion auf 50 ml mit PBS aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 900 x g, der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in PBS resuspendiert und auf 25 ml mit PBS aufgefüllt. Nun wurde eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Hierfür wurden 500 µl abgenommen und in einem Hämatologie-Analysator analysiert. Darauf folgte die Bestimmung des Gehaltes an CD34⁺ Zellen. Hierfür wurden 50 µl der Zellen mit spezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.4 Anreicherung von CD34⁺ Zellen

Mit Hilfe des *MBC CD34 Micro Bead Kit* wurden CD34⁺ Zellen aus den isolierten MNZ (siehe 2.2.3) angereichert. Die Anreicherung basiert auf dem Prinzip der magnetischen Zellseparation. Die MNZ wurden erneut pelletiert und in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Der Zellsuspension wurden 100 µl F_c-Blockingreagenz hinzugefügt. Nun erfolgte die Zugabe von anti-CD34 Antikörpern, die mit

ferromagnetischen Partikeln gekoppelt sind. Für 1×10^8 Zellen wurden 40 µl der Antikörperlösungen hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 4°C für 30 min. Nach der Inkubation wurde das Gefäß auf 50 ml mit MACS-Puffer aufgefüllt, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Die Zellen wurden wieder pelletiert und anschließend in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension tropfte nun durch einen Aufsatzfilter in die Separationssäule. Die Säule befand sich in einem starken Magnetfeld (*Midimacs Separation Unit*; Miltenyi Biotec). Die Separationssäule wurde zuvor mit MACS-Puffer äquilibriert. Die Säule wurde 3 x mit einem Säulenvolumen im magnetischen Feld gespült. Zellen ohne gebundene CD34-Antikörper wurden dabei entfernt, wohingegen Zellen mit gebundenen CD34-Antikörpern durch das magnetische Feld in der Säule zurückgehalten wurden. Nachdem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt wurde, konnten die CD34⁺ Zellen aus der Säule eluiert werden. Vom Durchfluss und der eluierten Zellsuspension wurden Proben entnommen, um den Gehalt an CD34⁺ Zellen und die Effizienz der Anreicherung zu analysieren.

Im Rahmen der Promotion wurden insgesamt 25 Nabelschnurrestblute verarbeitet mit einem mittleren Anteil CD34⁺ Zellen von 71,26% ($\pm 12,63\%$).

2.2.5 Herstellung virushaltiger Überstände

Zur Produktion von virushaltigem Überständen wurden HEK293T-Zellen verwendet. 25×10^6 HEK293T-Zellen/Flasche wurden am Tag vor der Transfektion in zwei T175-Zellkulturflaschen ausgesät und über Nacht inkubiert. Bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 60-80 % wurden die Zellen mit den drei beschriebenen Plasmiden (siehe 2.1.11) transfiziert. Als Transfektionsreagenz diente Polyethylen-Imin (PEI). PEI ist ein wasserlösliches, kationisches Polymer. Das Polymer kondensiert auf der DNA und überdeckt deren negative Ladung. Die DNA-Polymer-Komplexe können nun von der Zielzelle endozytotisch aufgenommen werden. Alle synthetischen Trägersysteme setzen die DNA im Zytoplasma frei (Boussif et al. 1995). Das Transfektionsreagenz wurde folgendermaßen zusammengesetzt: Pro Ansatz (zwei T175-Zellkulturflaschen) wurden 270 µl PEI-Lösung (1 mg/ml) in 6 ml serumfreiem Kulturmedium in 14 ml Gefäßen gegeben. In einem zweiten 14 ml Gefäß wurden je 30 µg Vektorplasmid, 30 µg Helferplasmid und 6 µg Hüllplasmid in serumfreiem Kulturmedium gelöst. Beide Gefäße wurden gut gemischt, vereint, gut gemischt und für 30 min in Dunkelheit bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde das vorhandene Kulturmedium von den

HEK293T-Zellen entfernt und durch neues Kulturmedium ersetzt. Nach der Inkubationszeit wurde die Transfektionslösung zu den Zellen appliziert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium durch Buttersäurenatriumsalz-haltiges (Endkonzentration 10 mM) Kulturmedium ersetzt. Durch das Buttersäurenatriumsalz wird die Induktion des CMV-Promoters verstärkt, was zu zwölfmal höheren Virustitern führen kann (Radsak et al. 1989; Leurs et al. 2003). Nach 6-8 Stunden wurde das Medium durch frisches Kulturmedium ersetzt. Die Zellen wurden nun 18-22 Stunden inkubiert. Nun wurde das Medium gesammelt und durch einen 0,45 µm Filter filtriert. Der filtrierte Mediumüberstand wurde in aerosoldichte 40 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und für 90 min bei 25.000 x g und 4°C zentrifugiert. In dem entstandenen transparenten Pellet waren die Viruspartikel ankonzentriert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 2 ml Kulturmedium (IMDM, 20% FBS, 1% Pen/Strep) resuspendiert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -196°C aufbewahrt. Für die Bestimmung der Virustiter wurden je 50.000 HEK293T-Zellen mit 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnungen der virushaltigen Überstände versetzt und über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag wurde das virushaltige Medium abgenommen und die Zellen nach einem Waschschrift mit frischem Medium versetzt.

2.2.6 Transduktion von CD34⁺ Zellen mit virushaltigem Überstand

Die stabile Transduktion mit virushaltigem Überstand erfolgte in 24-Loch Suspensionskulturplatten, die zuvor nach Herstellerangaben mit *Retronektin* (Takara, Japan) beschichtet wurden. In eine Vertiefung wurden zunächst 10-500 µl, entsprechend dem berechneten Titer, virushaltiger Überstand pipettiert. Zu dem Überstand wurden 1×10^5 CD34⁺-Zellen hinzugegeben. Das Kulturmedium enthielt die früh wirkenden Zytokine FLT3L, TPO und SCF (Endkonzentration 10 ng/ml). Nach 12-14 Stunden wurden die Zellen geerntet, mit Medium gewaschen, pelletiert und in frischem Kulturmedium resuspendiert. In der Regel wurden pro Versuchsreihe bzw. pro Nabelschnurrestblut zehn Kandidatengene transduziert. In jeder Versuchsreihe wurden eGFP-transduzierte und nicht-manipulierte Zellen in gleicher Zellzahl als Kontrollen mitgeführt.

2.2.7 Transduktion von FaDu-, N-KM- und THP-1-Zellen mit virushaltigem Überstand

Die stabile Transduktion mit virushaltigem Überstand erfolgte in 6-Loch Gewebekulturplatten. In eine Vertiefung wurden zunächst $5-10 \times 10^4$ Zellen (FaDu-, N-KM- oder THP1-Zellen) appliziert und ÜN kultiviert. Am nächsten Tag wurden 10 µl Virusüberstand hinzupipettiert und inkubiert. Nach 12-14 Stunden wurden die Zellen geerntet, mit Medium gewaschen, pelletiert und in frischem Kulturmedium resuspendiert.

2.2.8 Durchflusszytometrische Sortierung von transduzierten Zellen

Transduzierte FaDu-, N-KM- und THP1-Zellen wurden 7-10 Tage kultiviert und mikroskopisch beobachtet. Es folgte eine durchflusszytometrische Zellseparation von FaDu-, N-KM- und THP1-Zellen mit eGFP-Signal. Hierfür wurden die Zellen geerntet und mit Hilfe des FACS Aria I Durchflusszytometers wurden Zellen mit eGFP-Signal von Zellen ohne Signal voneinander getrennt. Hierbei wurden gemessene Zellen direkt nach der Messung physikalisch getrennt und die gewünschten Zellen wurden in einem separaten Gefäß aufgefangen. Um den Erfolg der Zellsortierung zu kontrollieren, wurden nach der Zellsortierung die sortierten Zellen abermals mit den gleichen Einstellungen am FACS Aria I gemessen (Reanalyse). Die Zellen wurden nach der Zellsortierung bei 900x g zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden in frischem Kulturmedium resuspendiert und zunächst für 5-7 Tage in einer 24-Loch Gewebekulturplatte kultiviert. Es folgte eine kulturbedingte Expansion der Zellen, indem die Kulturgefäße schrittweise gegen Kulturgefäße mit größeren Volumina getauscht wurden. Die Zellen wurden geerntet, mit Medium gewaschen, in frischem Kulturmedium resuspendiert und in das neue, größere Kulturgefäß überführt. Nachdem die so expandierten Zellen in einer T175 Flasche ca. 90 % konfluent waren, wurden die Zellen 1:10 gesplittet, wobei 90% dieser Zellen eingefroren und bei -196°C gelagert wurden. Die restlichen 10 % wurden in eine neue T175 Flasche mit frischem Kulturmedium weiter kultiviert.

2.2.9 Durchflusszyometrie

Die Grundlage von durchflusszytometrischen Messungen sind der hydrodynamische Transport von Zellen und deren optische Vermessung sowohl mit, als auch ohne spezifischen Färbungen. Eine Suspension von Zellen wird durch einen Hüllstrom

verdünnt und anschließend fokussiert in einer Aufreihung von Einzelzellen an einer Lichtquelle vorbeigeführt. Die Analyse basiert auf der Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenz in dem Moment, in dem die Zellen einen rechtwinkelig zum Probenfluss angeordneten Laserstrahl passieren. Hierbei werden als physikalische Messgrößen die Lichtstreuung der Zellen in einem engen Winkel zum Laserstrahl als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter; FSC*) und die Lichtstreuung im Winkel von 90° als Seitwärtsstreulicht (*side scatter; SSC*) detektiert. Das Vorwärtsstreulicht ist ein Maß für die Größe der Zellen. Das Seitwärtsstreulicht hängt von der Mehrfachstreuung durch intrazelluläre Kompartimente ab und gibt Auskunft über die Granularität der Zelle. Die Messung von Fluoreszenzsignalen erfolgt mit Hilfe von Farbteilerspiegeln und Bandpassfiltern, die für die optische Trennung der Emissionsspektren von verschiedenen Farbstoffen, wie zum Beispiel bei fluorchromkonjugierten Antikörpern oder einem fluoreszierenden Protein (GFP), verantwortlich sind. Die unterschiedlichen Lichtsignale werden dann über Photomultiplier (PMT) detektiert, verstärkt und in elektrische Signale umgewandelt. Die elektrischen Signale werden als digitalisierter Datensatz mit jeweils allen Messwerten einer einzelnen Zelle zusammengeführt. Aufgrund von Überschneidungen der Emissionsspektren von Fluoreszenzfarbstoffen ist eine Korrektur der Messdaten durch Kompensation notwendig. Ohne Kompensation würden Zellen, die nur mit einem Farbstoff gekennzeichnet sind, gegebenenfalls Mischsignale auf zwei oder mehr Detektoren erzeugen. Für die Kompensation werden Zellen, die nur mit einem Farbstoff markiert worden sind, als Bestimmungsgröße gemessen und die Messwerte mit Hilfe des Auswerteprogramms gegeneinander abgeglichen. Das Auswerteprogramm ermöglicht eine differentielle Darstellung der gesammelten Datensätze. In einem Histogramm wird die Anzahl der Signale gegen einen Parameter (z.B. FSC, SSC, FL1, FL2, usw.) dargestellt. In einer Punktwolkendarstellung (Dot-Plot) werden die Signale in einem Graphen dargestellt, wobei auf jeder Achse ein anderer Parameter abgebildet werden kann. In einem Dot-Plot sind die Messwerte einzelner Zellen entsprechend ihrer x- und y-Signalintensitäten als einzelner Punkt abgebildet. Die Darstellung in Dot-Plots erlaubt es, Informationen über die Verteilung von Intensitäten für einen oder mehrere Messparameter zu gewinnen. Weiterhin ist es möglich, in einem Dot-Plot bestimmte Bereiche zu markieren (*Gates*). Die Signale innerhalb der Bereiche kann man nun isoliert bezüglich weiterer Parameter betrachten, so dass nur Ereignisse innerhalb des Gates betrachtet werden. Eine verschachtelte

Verknüpfung von Gates ermöglicht eine Eingrenzung von Populationen, die über alle gemessenen Parameter definiert sind.

Eine spezielle Anwendung der Durchflusszytometrie ist das Sortieren von Zellen. In speziellen Geräten werden die Zellen unmittelbar nach der Messung physikalisch getrennt, indem der austretende Flüssigkeitsstrahl kurz elektrisch geladen wird. Dies geschieht in dem Moment, bei dem sich ein Tropfen mit dem gemessenen Ereignis in einem abreißenden Flüssigkeitsstrahl gebildet hat. Dieser Tropfen passiert zwei elektrisch geladene Ablenkplatten, die ihn aus dem Hauptstrom ablenken. Nach dieser Ablenkung fällt der Tropfen mit der Zelle in ein separates Auffangbehältnis. Die so sortierte bzw. angereicherte Zellsuspension kann nun wieder in Kultur genommen werden (Moldavan 1934; Crosland-Taylor 1953; Traganos 1984; Pierzchalski et al. 2011).

2.2.10 Färbungen von Zellen für durchflusszytometrische Analysen

Für die extrazelluläre Färbung von Zellen wurden fluorochromkonjugierte Antikörper 1:25 in einer Zellsuspension verdünnt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 4°C und in Dunkelheit. Vor der Messung wurden ungebundene Antikörper durch Waschen mit Isoton entfernt. Um tote Zellen aus den Messungen auszuschließen, wurden die Zellen zusätzlich mit Propidiumiodid (1 µg/ml) versetzt. Propidiumiodid markiert die DNA von Zellen, deren Zellmembran nicht mehr intakt ist. Für alle Ansätze wurden zur Kontrolle ungefärbte und mit Isotyp-Antikörpern gefärbte Zellen gemessen. Für die Analysen von transduzierten CD34⁺ Zellen, wurden diese mit CD34-ECD und CD133-PE Antikörpern gefärbt.

2.2.11 Bestimmung der absoluten Zellzahlen

Die Bestimmung von absoluten Zellzahlen bei durchflusszytometrischen Analysen erfolgte mit Hilfe von Flow-Count *Fluorospheres* von Beckman-Coulter nach Angaben des Herstellers.

2.3 Immunzytochemische Methoden

2.3.1 Extrazelluläre indirekte Antikörper-Färbung von Zellen

Die extrazelluläre Färbung der Zellen wurde wie die intrazelluläre Färbung durchgeführt (siehe 2.3.2.). Lediglich die Schritte zur Permeabilisierung der Zellmembran fielen weg.

2.3.2 Intrazelluläre indirekte Antikörper-Färbung von Zellen

Für die intrazelluläre Färbung von Antigenen mittels indirekter Antikörperfärbung wurden am Tag zuvor 5×10^4 Zellen/Loch in einer 24-Loch Flachbodenplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und die adhärennten Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 4% Para-Formaldehyd (PFA) in PBS für 20 min auf einem Taumler bei Raumtemperatur fixiert. Das PFA wurde abgenommen und die Zellen wurden zweimal kurz mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung wurde 0,1% Triton X-100 in PBS zu den Zellen gegeben, für 20 min auf dem Taumler inkubiert und anschließend wieder abgenommen. Optional wurden die Zellen für 10 min mit eiskaltem Methanol bei -20°C fixiert und permeabilisiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurden die Zellen mit 5% Serum aus der Spezies des sekundären Antikörpers in 300 μl PBS für 10 min auf dem Taumler inkubiert. Danach wurde der primäre, unkonjugierte Antikörper hinzugegeben, und es wurde für 60 min auf dem Taumler inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen und der sekundäre, fluorochromkonjugierte Antikörper hinzugegeben. Nach Inkubation für zwei Stunden wurden die Zellen zweimal kurz, dann über Nacht bei 4°C auf einem Taumler mit PBS gewaschen. Am nächsten Tag wurde das PBS abgeschüttet. Sobald die Restflüssigkeit in den 24-Loch Flachbodenplatten verdunstet waren, wurde ein Tropfen DAPI-haltiges Eindeckelmedium auf dem Objektträger verteilt und das Präparat mit einem Deckglas versiegelt. Die Platten wurden bis zur mikroskopischen Auswertung bei 4°C gelagert.

THP1 Zellen wurden vor der Färbung 48 Stunden mit Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) -haltigem Kulturmedium (Endkonzentration 100 ng/ml) kultiviert, woraufhin die Zellen adhärennt wurden.

2.4 Mikrobiologische Methoden

2.4.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Die Vorgehensweisen zur Herstellung von transformationskompetenten Bakterienzellen und deren Transformation basieren auf der Methode von Hanahan (Hanahan 1983).

Ausgehend von einem Bakterienausstrich des gewünschten *E.coli*-Stammes wird eine 5-10 ml Übernachts-Flüssigkultur in LB-Medium angelegt. Am folgenden Tag werden 100 ml LB-Medium mit 1 ml der Übernachtskultur inokuliert und bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Alle 30 bis 45 min werden Aliquots entnommen und

einer Absorptions-Messung in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm unterzogen. Bei Erreichen eines Wertes von $OD_{600} = 0,4-0,5$ werden die Bakterien 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 5000 x g sedimentiert. Das Pellet wird in 40 ml TFB1-Puffer resuspendiert und 10-20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C und 5000 x g werden die Zellen in 4 ml TFB2-Puffer resuspendiert, aliquotiert (100 µl) und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die weitere Lagerung erfolgt bei -80°C.

2.4.2 Transformation von transformationskompetenten Bakterien

Zur Standardtransformation werden die kompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Pro Transformationsansatz werden 7 µl Ligationsansatz zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgt ein Hitzeschock für 90 s bei 42°C im Heizblock, gefolgt von einer Abkühlung für 5 min im Eisbad. Nach Zugabe von 900 µl warmen LB-Medium werden die transformierten Bakterien zur Regeneration für 60 min unter Schütteln (250 rpm) bei 37°C inkubiert, bevor 20 - 100 µl auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum zur Selektion ausplattiert werden. Folgende Antibiotika werden je nach Klonierungsvektor verwendet: Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml). Nach Inkubation über Nacht bei 37°C bilden sich bei erfolgreicher Transformation Bakterienkolonien aus. Von den Platten werden zwischen 5 und 12 Klone mit einer sterilen Pipettenspitze abgenommen und in 4 ml LB-Medium Flüssigkultur mit Antibiotikum überführt. Für alle Versuche wurden der *E.coli* Stamm TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

Genotyp: F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *ara* Δ 139 Δ (*ara-leu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str^r) *endA1 nupG*

2.4.3 Kultivierung von *E.coli*

Für die Anzucht, Vermehrung und Selektion von *E.coli*-Bakterien wurden Flüssigkulturmedium (LB-Medium) und LB-Agar-Kulturplatten verwendet. Bakterienkulturen wurden bei 37°C inkubiert. Selektionsmedien wurden mit Antibiotika (Ampicillin 100 µg/ml und Kanamycin 50 µg/ml) versetzt.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Isolation von Gesamt-RNA

Die Aufreinigung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) durchgeführt. Hierbei wurde das Protokoll nach

Herstellerangaben angewandt. Es wurden kultivierte Zellen gesammelt, einmal in PBS gewaschen, und in RLT-Puffer aufgenommen und lysiert. Das Gemisch wurde auf die speziellen Anionenaustauschersäulen aus dem Kit appliziert. Hierbei fand eine selektive Bindung der freigesetzten RNA an die Siliziumdioxidmembran der Säule statt. Es folgten diverse Waschschrte, die kontaminierende DNA, Zelltrümer und Proteine von der Säule entfernten, während RNA in der Säulenmatrix verblieb. Die Säule wurde im Anschluss mit DNase I behandelt, um Reste von DNA zu entfernen. Die RNA wurde zuletzt in nukleasefreiem Wasser eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm.

2.5.2 Reverse Transkription/cDNA-Synthese

Die Phusion-Polymerase kann RNA nicht als Matrize zur DNA-Synthese innerhalb einer PCR-Reaktion benutzen. Daher ist es nötig, RNA in komplementäre DNA (cDNA) zu überführen. Diese Reaktion wird von reversen Transkriptasen katalysiert. Reverse Transkriptasen stammen ursprünglich aus Retroviren, die ihr RNA-Genom in DNA umschreiben, um sie in das Wirtsgenom integrieren zu können (Baltimore 1970; Temin und Mizutani 1970). Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem RT Superscript II Kit von Invitrogen gearbeitet. Alle Reaktionen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

RT-Reaktion:

1 µl Oligo(dT)-Primer (10µM)

2 µl dNTPs (5 mM)

1 µg RNA

mit H₂O auf 13 µl Gesamtvolumen ergänzen.

Die Anlagerung der Oligonukleotide erfolgte für 5 min bei 65°C im Heizblock. Anschließend wurden die Proben direkt auf Eis gestellt und 7 µl des Gesamt-Reaktionsansatzes hinzugegeben. Letzterer setzte sich wie folgt zusammen (Reaktionsgemisch für eine Reaktion):

4 µl 5x Erststrangpuffer

1 µl 0,1 M DTT

1 µl RNase Out

1 µl Superscript II

Der Ansatz wurde resuspendiert, kurz zentrifugiert und dann für 50 min bei 42°C inkubiert. Im Anschluss fand ein optionaler DNase I-Verdau statt, um Reste genomischer DNA zu entfernen.

2.5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um die gezielte Synthese von DNA aus Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) an einer DNA-Matrize zur Vervielfältigung von spezifischen DNA-Abschnitten mit Hilfe thermostabiler Polymerasen. Durch geeignete Wahl von sequenzspezifischen flankierenden Oligonukleotiden (Primer), kann man schnell und spezifisch DNA-Abschnitte amplifizieren (Mullis et al. 1986). Die PCR setzt sich aus drei Schritten zusammen:

1. Denaturierung
2. *Annealing*
3. Elongation

Als erstes wird der PCR-Ansatz erhitzt, wobei die DNA bei Temperaturen von 94°C-98°C komplett denaturiert. Nach einem Senken der Temperatur, welche dem Schmelzpunkt der spezifischen Oligonukleotide angepasst ist, findet der Annealing-Schritt statt. Hierbei hybridisieren die Oligonukleotide an die komplementäre Sequenz der Template-DNA. Nun findet eine Temperaturerhöhung auf 72 °C statt, wodurch das Aktivitätsoptimum der Polymerase erreicht wird. Das Enzym beginnt mit der Elongation der Oligonukleotide von 5' nach 3'. Hierbei dient die einzelsträngige DNA, an die das Oligonukleotid hybridisiert ist, als Matrize. Im Anschluss folgt wieder ein Denaturierungsschritt. Die einzelnen Schritte werden in 35 Zyklen wiederholt. Die Zielsequenz wird bei der PCR exponentiell vervielfältigt. Für die PCR wurde hauptsächlich mit der Phusion-Polymerase gearbeitet. Diese Polymerase ist in ihren Eigenschaften artifiziell verändert worden. Sie besitzt eine höhere Prozessivität gegenüber anderen thermostabilen Polymerasen (15s/kb). Zusätzlich zur 5'-3' Polymeraseaktivität und der 5'-3' Exonukleaseaktivität besitzt die Phusion-Polymerase eine 3'-5' Exonukleaseaktivität, womit sie eine Korrekturlesefunktion durchführt und dabei Basenfehlpaarungen während der Elongation korrigiert.

2.5.4 Standard PCR

Die ausgewählten Kandidatengene wurden aus cDNA von eukaryotischen Zellen über PCR und Phusion-Polymerase amplifiziert. Alle PCRs folgten einem Standardschema,

welches sich lediglich in den Oligonukleotiden (Primern) unterschied. Alle Oligonukleotide hatten eine T_m um die 63°C. Unterschiede in der T_m waren nicht größer als 5°C.

Tab. 2.7: Reaktionsansatz für die Standard PCR.

Menge μ l	Reagenz
5	5x HF-Puffer (7,5 mM $MgCl_2$)
1	dNTPs (12,5 mM)
1	5' Primer (10 μ M)
1	3' Primer (10 μ M)
0,25	Phusion-Polymerase
1	Template-DNA
15,75	H ₂ O (nukleasefrei)
25 μ l	Gesamt

Tab. 2.8: Programmeinstellungen des Thermozyklers für eine Standard PCR.

Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
98°C	2 min	1 x
98°C	30 sek	5 x
58°C	30 sek	
72°C	1:30 min	
98°C	30 sek	35 x
63°C	30 sek	
72°C	1:30 min	
72°C	7 min	1 x
4°C	∞	

Die Einstellungen des Programms wurden bei Bedarf variiert (z.B. die Elongationszeit bei DNA-Sequenzen >2 kb)

2.5.5 Touch-Down PCR

Bei Problemen während der PCR-Amplifikation, was sich z.B. durch viele Nebenbanden in einem analytischen Agarosegel zeigte, wurde ein modifiziertes PCR-Programm verwendet, um ein verbessertes Hybridisieren (*annealing*) der Primer herbeizuführen (Don et al. 1991).

Tab. 2.9: Reaktionsansatz für die Touch-Down PCR.

Menge µl	Reagenz
1	dNTPs (12,5 mM)
2,5	5x HF-Puffer (7,5 mM MgCl ₂)
1,25	10x Taq-Puffer (15 mM MgCl ₂)
0,75	Q-Solution
0,4	Phusion-Polymerase
0,25	Taq-Polymerase
1	5' Primer (10 µM)
1	3' Primer (10 µM)
1	Template-DNA
15,85	H ₂ O (nukleasefrei)
25 µl	Gesamt

Tab. 2.10: Programmeinstellungen des Thermozyklers für eine Touch-Down PCR.

Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
98°C	2 min	1 x
98°C	10 sek	3 x
60°C	20 sek	
72°C	1:30 min	
98°C	10 sek	3 x
58°C	20 sek	
72°C	1:30 min	
98°C	10 sek	3 x
56°C	20 sek	
72°C	1:30 min	
98°C	10 sek	30 x
54°C	20 sek	
72°C	1:30 min	
72°C	10 min	1 x
4°C	∞	

Die Einstellungen des Programms wurden bei Bedarf variiert (z.B. die Elongationszeit bei DNA-Sequenzen >2 kb)

2.5.6 Gelelektrophorese von DNA

Nukleinsäuren sind aufgrund der Phosphatgruppen im Rückgrat negativ geladen. Werden Nukleinsäuren in ein elektrisches Feld gebracht, wandern sie zur positiv geladenen Anode. In einem Netzwerk aus polymerisierter Agarose werden Nukleinsäuren ihrer Größe nach aufgetrennt, wobei kleinere Nukleinsäure-Fragmente schneller das Netzwerk durchwandern als größere. Auch die Konformation der DNA ist

für die Wanderungsgeschwindigkeit von Bedeutung. Ringförmige DNA läuft umso schneller, je größer ihre Verwindungszahl ist, linearisierte DNA läuft schneller, als das entspannte, geschlossene Plasmid. Die Trennschärfe hängt von der Laufweite der einzelnen Fragmente und der Konzentration der Agarose ab. Um die DNA-Banden im Gel sichtbar zu machen, wird Ethidiumbromid zugegeben, das zwischen den Basen interkaliert und bei Anregung mit UV-Licht eine Fluoreszenz erzeugt.

Als Größenstandard wurde die 1 kb+ DNA Ladder von Fermentas verwendet. Für 1%-Gele wurde 1 g Agarose in 100 ml 1x TAE gelöst, aufgeköcht, das Gemisch wieder auf ca. 50°C abgekühlt, und dann 3 µl Ethidiumbromidlösung hinzugegeben. Mit dieser Lösung wurde das Gel mit einem Kamm für die gewünschte Probenanzahl gegossen. Wenn das Gel vollständig polymerisiert war wurde es in einer Elektrophoresekammer mit 1x TAE überschichtet und der Kamm vorsichtig entfernt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 6x Ladepuffer (Fermentas) versehen und in die einzelnen Taschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt. Die DNA-Banden wurden mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht und über eine Kamera mit angeschlossenem Drucker dokumentiert.

2.5.7 Aufreinigung von PCR-Fragmenten und enzymatisch gespaltener DNA aus Agarosegelen.

Die Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des *Wizard Gel and PCR Purification Kit* von Promega nach Angaben des Herstellers. Die gewünschte Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Gefäß überführt. Gewichtsabhängig wurde ein Lösungspuffer zugegeben und der Ansatz leicht erwärmt. Die entstandene Lösung wurde auf eine Silicasäule gegeben und 2x mit einem Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die DNA in 30-50 µl TE-Puffer eluiert. Die DNA war sofort für Folgeversuche verwendbar.

2.5.8 Aufreinigung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Minipräparation)

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurden 2 ml einer 4 ml Übernachtkultur 1 min bei 10.000 x g in 2 ml Reaktionsgefäßen pelletiert und das Pellet in 200 µl TELT-Puffer resuspendiert. Zur Lyse wurde die Bakterienlösung 5 min bei 95°C inkubiert und danach für 5 min in Eiswasser abgekühlt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 10 min bei 10.000 x g wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurden 200 µl Isopropanol hinzugefügt

und der Ansatz zur Durchmischung mehrmals invertiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 15.000 x g für 15 min wurde das aufgetretene DNA-Pellet einmal mit 800 µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl Wasser gelöst.

2.5.9 Aufreinigung von Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxipräparation)

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA im großen Maßstab wurde das *Plasmid Plus Maxi* Kit von Qiagen nach den Angaben des Herstellers verwendet. Zunächst wurden die Bakterien aus einer 100 ml Übernackkultur durch Zentrifugation bei 5000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in einem pH-neutralen Puffer resuspendiert. Nun folgte die Zugabe eines alkalischen Puffers zur Lyse der Bakterien. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde ein saurer Puffer zur Neutralisation des pH-Wertes der Bakterienlösung zugegeben. Nach mehrmaligem Schwenken wurde die Lösung mit dem nun auftretenden Präzipitat (Zelltrümmer und Proteine) in eine vorgefertigte Spritze samt Filter gegeben. Nach 10 min Inkubationszeit, hat sich das Präzipitat an der Oberfläche der Lösung gesammelt, so dass nun zwei Phasen vorlagen: Präzipitat und Lösung. In der Lösung befand sich die Plasmid-DNA. Mit dem zugehörigen Spritzenstöpsel wurde die Lösung durch den Filter in der Spritze gedrückt und in einem 50 ml Gefäß gesammelt. Die Spritze mit dem zurückgehaltenen Präzipitat wurde verworfen. Nach Zugabe von 5 ml BB-Puffer wurde die Lösung auf die DEAE-Anionenaustauschersilikamatrix der Säule appliziert. Die Bindung der DNA an die Säulenmatrix erfolgt bei niedrigem pH-Wert und niedriger Salzkonzentration aufgrund der Interaktion der negativ geladenen Phosphatreste des DNA-Rückgrats mit den positiv geladenen Diethylaminomethanol-Gruppen auf der Oberfläche der Anionenaustauschermatrix. Die Säule wurde anschließend mit einem 96% Ethanol-Puffer und einem ETR (*endotoxin removal buffer*) gewaschen, um die DNA von restlichen Salzen und bakteriellen Endotoxinen zu befreien. Zuletzt wurde die DNA mit einem schwach alkalischen Puffer eluiert.

2.5.10 Konzentrationsbestimmung von DNA

Für die Quantifizierung von Nukleinsäuren wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Die aromatischen Basen der eingesetzten einzelsträngigen DNA zeigen eine spezifische Absorption bei Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Absorption von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 33 µg/ml einzelsträngiger bzw. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Aus den

Quotienten OD_{260}/OD_{280} und OD_{260}/OD_{230} konnten Aussagen über die Reinheit der Probe getroffen werden. Die Absorption bei 280 nm verdeutlicht die Verunreinigung durch Proteine, wohingegen Peptide, aromatische Verbindungen und Kohlenhydrate bei 230 nm ihr Absorptionsmaximum haben. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} sollte größer als 1,8 sein, während der Quotient OD_{260}/OD_{230} größer als 2 sein sollte. (Wilfinger et al. 1997).

2.5.11 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen wurden alle nach der Ketten-Abbruch-Methode durchgeführt (Sanger et al. 1977). Einer PCR-Reaktion werden Didesoxynukleosid-Triphosphate (ddNTPs) beigelegt. Diesen ddNTPs fehlt ein freies 3'OH-Ende, welches die Polymerase zur Verlängerung des DNA-Strangs benötigt. So entstehen DNA-Fragmente unterschiedlichster Länge, wobei die verschiedenen ddNTPs mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert sind. In einem Kapillar-Gelsystem werden diese Fragmente der Größe nach aufgetrennt und mit einem Laser angeregt. Je nach Größe des Fragments, respektive je nach Farbstoff, wird Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittiert, das wiederum von einem Photoelement registriert und an einen Computer weitergeleitet wird. Zuletzt werden mittels eines geeigneten Programms die Messdaten zu einer Sequenz zusammengefügt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden von dem Dienstleister *LGC Genomics*, Berlin durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm *Geneious*.

2.5.12 Enzymatische Spaltung von DNA

Für die enzymatische Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II eingesetzt. Diese erkennen eine spezifische palindromische Sequenz innerhalb der DNA und schneiden sie an dieser Erkennungsstelle. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen und die dazugehörigen Puffer wurden nach Herstellerangaben verwendet. Der Erfolg der Reaktion wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.5.13 Ligation von DNA-Fragmenten in bakterielle Plasmide

Bei der Ligation werden DNA-Fragmente in Plasmid-DNA eingefügt. Durch die unterschiedlichen Endonuklease-Erkennungssequenzen und deren enzymatischer Spaltung war die Orientierung der DNA-Insert-Fragmente vorgegeben. Mit Hilfe der

T4-DNA-Ligase wurde die freie 5'-Phosphatgruppe der einzufügenden DNA-Fragmente mit der freien 3'-Hydroxylgruppe der Plasmid-DNA unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung ligiert. 50-200 ng des linearisierten Plasmids wurden mit dem sechsfachen molaren Überschuss des zu ligierenden Inserts und mit 1-5 Weiss-Einheiten T4-DNA-Ligase bei 4°C für 12 Stunden inkubiert. 7-10 µl des Ligationsansatzes wurden zur Transformation von transformationskompetenten *E. coli* eingesetzt.

Tab. 2.11: Reaktionsansatz für die Ligation.

Menge µl	Reagenz
1	Plasmid DNA (50-100 ng)
6x mol. Überschuss	Insert DNA
2	10x Ligase Puffer (inkl. ATP)
1	T4-Ligase (1 Weiss Unit/µl)
x	H ₂ O (nukleasefrei)
20 µl Gesamt	

2.6 Konstruktion von Expressionsplasmiden

Die offenen Leseraster ausgewählter Kandidatengene wurden mittels PCR amplifiziert. Als Matrize wurden cDNA-Banken und Plasmide (Tab. 2.12) verwendet. Für die Konstruktion einer ORF-IRES-eGFP-Kassette wurden die PCR-Produkte in der Regel in entsprechend geöffnete pIRES-eGFP Vektoren subkloniert. Die rekombinanten Plasmide wurden jeweils durch eine Restriktionsanalyse bestätigt. Für die Konstruktion einer ORF-eGFP-Kassette wurden die PCR-Produkte in den *XhoI/BamHI*-geöffneten peGFP-N1 überführt. Die zur Amplifikation verwendeten 3'- Oligonukleotide für Fusionsproteinkonstrukte kodierten ein deletiertes Stop-Kodon, so dass in Folge der Transkription und Translation der Kassette in den Zielzellen nach Transduktion ein Fusionsprotein entsteht. Erstellte rekombinante Plasmide wurden durch Restriktionsanalysen überprüft. Aus den rekombinanten Plasmiden peGFP-N1/pIRES-eGFP wurde in der Regel ein *NheI/BsrGI*-Fragment isoliert und in den *NheI/BsrGI* geöffneten lentiviralen Zielvektor pCL6IEGwo überführt. Fertige Plasmide wurden durch Restriktionsanalysen identifiziert und durch Sequenzierungen verifiziert. Mit Hilfe von rekombinanten pCL6IEGwo Vektoren wurden nun virushaltige Medienüberstände hergestellt (siehe 2.1.11 und 2.2.5).

Die offenen Leseraster der Gene *ARNTL2*, *CEBPD*, *KLF2*, *KLF11*, *MEOX2*, *SOX4*, *ZNF281*, *ZNF367* und *ZNF395* konnten nicht erfolgreich aus den eigens hergestellten cDNA-Banken amplifiziert werden. Die Gene wurden kommerziell bei der Firma Imagenes (Berlin) erworben. Die Gene *SOX9* und *SOX11* wurden freundlicherweise von Phillipe Jay (Instituté Génomique Fonctionelle, Université Montpellier) zur Verfügung gestellt. Die Gene *ARNTLa* und *ARNTLb* wurden freundlicherweise von Masaaki Ikeda (Research Center for Genomic Medicine, Saitama Medical University) zur Verfügung gestellt. Das Gen *BHLHB2* wurde freundlicherweise von Kaiji Tanimoto (Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University) zur Verfügung gestellt. Die Gene *ATF2*, *CBX5*, *HOXA5* und *TCF19* wurden vom Center for Cancer Systems Biology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA (hORFeome v8.1; <http://horfdb.dfci.harvard.edu/hv5/hv8/index.php>) zur Verfügung gestellt (Tab. 2.12). Die Gene wurden mittels PCR amplifiziert und in entsprechende Vektoren überführt.

Tab 2.12: Erworbene cDNAs in Vektoren.

Gen	Produkt bp	Vektor	Herkunft
ARNTL2	1910	IRATp970B084D	IMAGENES
ARNTLa	1877	ARNTLa_pcDNA3	M.IKEDA
ARNTLb	1748	ARNTLb_pcDNA3	M.IKEDA
ATF2	1518	ATF2_pDONR223	hORFeome
BHLHB2	1238	p3xFLAG-DEC1	K. Tanimoto
CBX5	606	CBX5_pDONR223	hORFeome
CEBPD	809	IRATp970B02127D	IMAGENES
HOXA5	813	HOXA5_pDONR223	hORFeome
KLF11	1539	IRATp970D0565D	IMAGENES
KLF2	1068	IRAUUp969C11112D	IMAGENES
KLF4	1431	KLF4_pIRES-eGFP	AG Giebel
MEOX2	914	IRATp970B1219D	IMAGENES
PROX1	2214	PROX1_pIRES-eGFP	AG Giebel
SOX11	1326	SOX11_pBSK-	P.Jay
SOX2	954	SOX2_pIRES-eGFP	AG Giebel
SOX4	1424	IRAUUp969B12110D	IMAGENES
SOX9	1530	SOX9_pcDNA3	P.Jay
TCF19	1038	TCF19_pDONR223	hORFeome
ZNF281	2687	IRATp970C0565D	IMAGENES
ZNF367	1052	IRCMp5012F1116D	IMAGENES
ZNF395	1541	IRATp970B63	IMAGENES
CD53	688	CD53_pIRES-eGFP	AG Giebel
CD53s	589	CD53s_pIRES-eGFP	AG Giebel
CD63	731	CD63_pIRES-eGFP	AG Giebel

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 SDS-PAGE

Eine gebräuchliche Methode zur Auftrennung von Proteinen ist die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Geschwindigkeit, mit der Moleküle durch ein elektrisches Feld wandern, hängt von drei Faktoren ab: ihrer Größe, ihrer Form und ihrer elektrischen Ladung. Im Fall der SDS-PAGE ist allerdings einzig die Masse des Moleküls für die Wanderungsgeschwindigkeit ausschlaggebend. Erreicht wird dies, indem man sowohl dem Gel, als auch dem Laufpuffer SDS zugibt. Dieses Detergenz mit stark amphipatischen Eigenschaften denaturiert oligomere Proteine und zerlegt sie in ihre Untereinheiten. SDS-Moleküle binden zudem an die entfalteten Peptide und versehen sie mit einer stark negativen Ladung, so dass sie in einem elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode wandern. Um die Denaturierung zu vervollständigen, werden den Proteinen im Probenpuffer Thiole zugegeben, welche die Disulfidbrücken innerhalb der Proteine spalten. Damit alle aufgetragenen Proteine zum gleichen Zeitpunkt anfangen aufgetrennt zu werden, wird das Gel in Sammel- und Trenngel unterteilt. Zur Auftrennung wurden 12%ige Gele verwendet (Laemmli 1970).

2.7.2 Aufreinigung von Proteinen aus Zelllysaten

Die Proben stammten aus stabil transduzierten, durchflusszytometrisch sortierten und kultivierten N-KM-Zellen. Es wurden pro transduzierter Zelllinie etwa 1×10^6 Zellen geerntet und lysiert. Nach der erfolgreichen Zelllyse mit NP-40-Puffer wurden die Proben mit denaturierendem 5x SDS-Probenpuffer versehen und vor dem Beladen der SDS-PAGE-Gele für 5 min bei 95°C inkubiert.

2.7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCA Protein Assay Reagent Kit nach Anleitung des Herstellers. Mit Hilfe einer Eichgerade bekannter BSA-Konzentrationen wurden die unbekannten Proteinkonzentrationen der Lysate berechnet. Mittels eines ELISA-Readers wurde die Absorption bei 562 nm gemessen.

2.7.4 Präparation des Polyacrylamidgels

Zunächst wurde pro Gel eine saubere Glasplatte mit seitlich eingesetzten Platzhaltern und Kämmen von Aluminiumplatten getrennt und in der dafür vorgesehenen Gelgießvorrichtung eingesetzt. Die Komponenten des Trenngels wurden gemischt (Tab.

2.13). APS und TEMED wurden zuletzt zugegeben und lösten die Polymerisation der Gelmatrix aus.

Tab. 2.13: Reaktionsansatz für ein 12% Polyacrylamidgel.

Sammelgel		Trenngel	
Menge	Reagenz	Menge	Reagenz
3,4 ml	H ₂ O	6,6 ml	H ₂ O
0,83 ml	30% Acrylamid-Mix	8 ml	30% Acrylamid-Mix
1,26 ml	0,5 M Tris, pH6,8	5 ml	0,5 M Tris, pH6,8
0,05 Ml	10% SDS	0,2 ml	10% SDS
0,05 ml	APS	0,2 ml	APS
0,005 ml	Temed	0,008 ml	Temed

Der Ansatz wurde in den Aufbau gegossen. Eine Überschichtung mit Isopropanol sicherte eine glatte Oberfläche und verbesserte durch Luftausschluss die Polymerisation. Insgesamt ließ man das Trenngel zwischen 45-60 min aushärten, anschließend konnte analog das Sammelgel pipettiert und der gewünschte Kamm möglichst luftblasenfrei eingesetzt werden. Nach mindestens 30 min Polymerisierungszeit konnte das Gel beladen werden. Vor dem Beladen wurden die Gele in eine Gelelektrophoresekammer gesetzt, diese mit SDS-Laufpuffer gefüllt und die Kämme entfernt. Als Proteinstandard wurde immer die PageRuler Prestained Protein Ladder von Fermentas verwendet.

2.7.5 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamidgele wurden bei einer konstanten Stromstärke von 25 A/Gel gefahren. Wenn das Bromphenolblau des Probenpuffers aus dem Gel ausgelaufen war, wurde die Elektrophorese gestoppt.

2.7.6 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran (Western Blot)

Zuerst wurde ein dem Gel entsprechend großes Stück Nitrozellulosemembran für 2-3 min in MetOH aktiviert. Danach wurden sowohl die Membran, als auch das Gel 15-30 min in Transferpuffer äquilibriert. Um die Proteine auf die Membran zu transferieren, wurde mit einer dafür vorgesehenen Kammer gearbeitet. Bei dem schichtweisen Aufbau der Kassette laut Herstellerangaben ist vor allem die Transferrichtung (von negativ nach positiv) zu beachten. Um Luftblasen zu vermeiden, wurde die Blot-Kassette in einer mit Transferpuffer gefüllten Schale zusammengesetzt. Der Blot-Vorgang wurde über Nacht

bei 20 V durchgeführt. Im Anschluss wurde die PVDF-Membran 1-2 Stunden in PBST-Puffer + 5% Milchpulver abgeblockt, um spätere unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Danach wurde die Membran 3x 10 min in PBST gewaschen.

2.7.7 Antikörperdetektion

Die Membran wurde über Nacht bei 4°C mit dem gewünschten Primär-AK inkubiert (siehe Tab. 2.04). Nach der 1. Inkubation wurde 3x mit PBST bei RT gewaschen und anschließend mit dem gewünschten (*horseradish peroxidase*) HRP-konjugierten sekundär-AK eine Stunde inkubiert. Nach weiterem dreimaligen Waschen mit PBST war es möglich, mit Hilfe einer HRP-Substratlösung eine enzymatische Reaktion der HRP hervorzurufen, welche luminesziert. Diese Lumineszenz wurde mit Hilfe des Detektionsgerätes FX-7 festgehalten.

2.7.8 Inaktivierung der *horseradish peroxidase* – HRP

Eine PVDF-Membran die bereits für eine proteinbiochemische Analyse (Western Blot + Antikörperdetektion) verwendet wurde, konnte wiederholt für eine weitere proteinbiochemische Analyse herangezogen werden, indem man die AK-gebundene HRP mittels „*quenching*“ irreversibel inaktiviert (van Gijlswijk et al. 1996; Hopman et al. 1997; Zaidi et al. 2000). Hierzu wurde die verwendete PVDF-Membran für 5-10 min. in einer 10 % Wasserstoffperoxidlösung inkubiert und danach 3x mit PBST bei RT gewaschen. Es folgte eine weitere Antikörperdetektion (siehe 2.6.7)

3 Ergebnisse

3.1 Vorarbeiten

Mit dem Ziel, neue Mediatoren zu identifizieren, die bei dem Prozess der Selbsterneuerung *versus* Differenzierung von humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen beteiligt sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst verschiedene Faktoren selektioniert, die an diesem Prozess beteiligt sein können (siehe Tab 1.1). Diese Kandidatengene wurden in lentivirale Vektoren kloniert und entsprechende lentivirale Partikel generiert. Es wurden Gene ausgewählt die Transkriptionsfaktoren kodieren, welche komplexer Genexpressionsanalysen zufolge, stärker in primitiveren als in reiferen humanen hämatopoetischen Progenitoren exprimiert waren. Aufgrund der Tatsache, dass die membranmikrodomänen Organisatoren CD53 und CD63 asymmetrisch verteilt gefunden worden sind, entstand die Annahme, dass diese den Prozess der Selbsterneuerung *versus* Differenzierung beeinflussen. Daher sollte der Einfluss von membranmikrodomänen organisierenden Proteinen wie CD9, CD37a, CD37b, CD53, CD53short, CD63, CD81, CD82, CD151 sowie FLOT1 und FLOT2 getestet werden. Sofern die Tetraspanine keinen Einfluss auf das Zellschicksal ausüben, könnten sie in Form von eGFP-Fusionsproteinen gute Werkzeuge darstellen, um asymmetrische Zellteilungen an lebenden Zellen lichtmikroskopisch zu verfolgen.

3.2 Generierung lentiviraler Vektoren

Um potentielle Effekte von Kandidatengen zu untersuchen, müssen diese als experimentelle Voraussetzung, in den zu untersuchenden Zellen stabil überexprimiert werden. Um die Kandidatengene in den HSVZ stabil zu exprimieren, wurde die Methode des lentiviralen Gentransfers gewählt. Um Lentiviren herzustellen, mussten lentivirale Vektoren, die für die Kandidatengene kodieren, generiert werden. Hierfür wurden cDNA-Banken aus der RNA verschiedener Zellen generiert. Diese CDNA-Banken dienten als Matrize zur PCR basierten Amplifikation der Kandidatengene. Die PCR-Produkte wurden in transiente Plasmide überführt, welche in Folge für eine Expressionskassette aus Kandidatengen, IRES (*internal ribosomal entry site*)-Sequenz und einem eGFP als Reporterprotein kodieren. Die IRES-Sequenz ermöglicht hierbei die separate Expression des Kandidatengens und des eGFP. Diese Expressionskassette wurde aus den transienten Plasmiden in lentivirale Vektoren überführt. Mit Hilfe dieser

Vektoren können virushaltige Medienüberstände, wie unter 2.2.5 beschrieben, hergestellt werden. Diese Überstände bzw. Anteile davon werden zu frisch isolierten CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurrestblut appliziert, was eine stabile Transduktion der Zellen mit den Kandidatengen ermöglicht.

3.2.1 Generierung der cDNA ausgewählter Kandidatengene

Expressionsprofile von humanen umbilikalen Venenendothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells, HUVEC*) und endothelialen koloniebildenden Zellen (*endothelial colony forming cells, ECFC*) zeigten auf, dass einige Kandidatengene in diesen Zellen exprimiert werden. Damit eigneten sich cDNA-Banken dieser Zellen für eine PCR-basierte Amplifikation der Kandidatengene. Es wurden cDNA-Banken aus diesen Zellen hergestellt, deren Qualitäten für hiesige Zwecke nicht analysiert wurde. Die Zellen lagen in der Arbeitsgruppe vor (Denecke et al. 2013). Die generierten cDNA-Banken dienten als Matrize zur Amplifikation von Kandidatengen mittels spezifischer Oligonukleotide.

3.2.2 Konzeption spezifischer Oligonukleotide

Die offenen Leseraster der Kandidatengene wurden mittels PCR spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. Im weiteren Verlauf wurden die offenen Leseraster in die multiple Klonierungsstelle (MKS) von transienten pIRES-eGFP Plasmiden überführt. Die MKS liegt in den verwendeten Plasmiden vor einer IRES-Sequenz, gefolgt von einem eGFP-Reportergen. Durch die Ligation des Kandidatengens in die MKS entsteht eine Expressionskassette, die für ein offenes Leseraster, gefolgt von der IRES-Sequenz und einem eGFP kodiert. Diese Kassette wird anschließend in lentivirale pCL6IEGwo (pCL6) Vektoren überführt.

Für die PCR-basierte Amplifikation der Kandidatengene wurden spezifische Oligonukleotide (Primer) konzipiert, die anschließend kommerziell synthetisiert wurden. Die verwendeten 5'-Oligonukleotide wurden so konzipiert, dass sie 19-25 bp der kodierenden Sequenz der jeweils zu amplifizierenden Gene inklusive Start-Kodon umfassen. Unmittelbar davor wurde eine 6 bp große Kozak-Sequenz implementiert, welche die Translation entsprechender Transkripte in Säugetierzellen verstärkt (Kozak 1984; Kozak 1984; Kozak 1987). Damit die Amplifikate in geeignete Zielvektoren überführt werden konnten, wurde zusätzlich eine Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenz im 5'-Bereich implementiert. Diese ist laut der annotierten

Sequenzen nicht in den kodierenden Regionen vorhanden. Sie wird flankiert von sechs zusätzlichen Basen und befindet sich vor der Kozak-Sequenz. Die 3'-Primer umfassen 19-25 bp der kodierenden Sequenz inklusive Stop-Kodon. Im 5'-Bereich wurde ebenfalls eine Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenz eingebaut, die nicht in der kodierenden Sequenz vorhanden ist. Dieser folgen ebenfalls sechs Basen (Abb. 3.1).

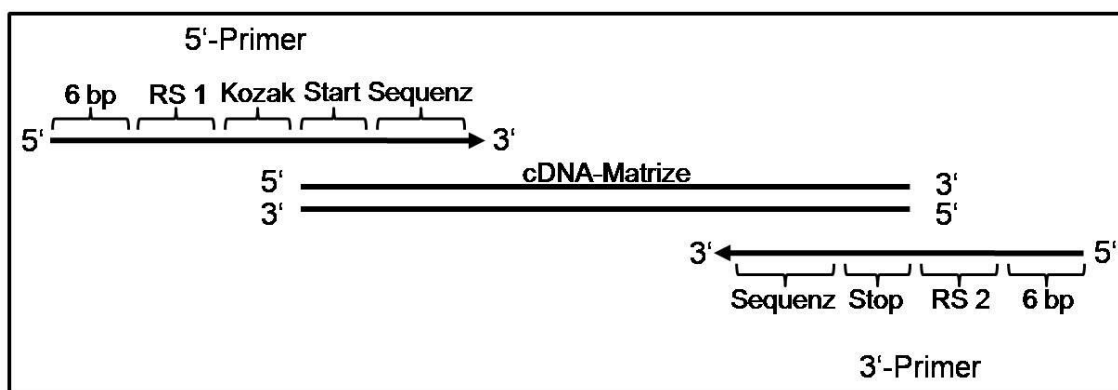


Abb. 3.1: Primerdesign verwendeter Oligonukleotide.

Die spezifischen Oligonukleotide (5'- und 3'-Primer) hybridisieren bei der PCR an die cDNA Matrize. RS1+2: Restriktionsschnittstellen; Start: Start-Kodon; Stop: Stop-Kodon; Kozak: GCCACC Sequenz: Genspezifische Basenabfolge; 6 bp: sechs Basen (5': TCAACA, 3': CTATTG).

Tab. 3.1: Verwendete Restriktionsendonukleasen in den 5'- und 3'-Oligonukleotiden.

Gen	5' Schnittstelle	3' Schnittstelle	Produkt bp	Herkunft	Zielvektor
ARNTL2	XhoI	BamHI	1910	IRATp970B084D	pBSK+
ARNTLa	XhoI	BamHI	1877	ARNTLa_pcDNA3	pBSK+
ARNTLb	XhoI	BamHI	1748	ARNTLb_pcDNA3	pIRES-eGFP
ATF2	XhoI	BamHI	1518	ATF2_pDONR223	pIRES-eGFP
BHLHB2	NheI	EcoRI	1238	p3xFLAG-DEC1	pIRES-eGFP
CBX5	EcoRI	BamHI	606	CBX5_pDONR223	pIRES-eGFP
CEBPD	XhoI	BamHI	809	IRATp970B02127D	pIRES-eGFP
ELF1	XhoI	NheI	1860	HUVEC cDNA	pBSK+
FLOT1	EcoRI	BamHI	1284	ECFC cDNA	pIRES-eGFP
FLOT2	EcoRI	BamHI	1287	ECFC cDNA	pIRES-eGFP
FOXP1a	XhoI	BamHI	2030	HUVEC cDNA	pBSK+
FOXP1b	XhoI	BamHI	344	HUVEC cDNA	pIRES-eGFP
FUS	XhoI	BamHI	1581	ECFC cDNA	pBSK+
HOXA5	XhoI	BamHI	813	HOXA5_pDONR223	pIRES-eGFP
ID3	XhoI	BamHI	360	HUVEC cDNA	pIRES-eGFP
ID4	XhoI	BamHI	486	HUVEC cDNA	pIRES-eGFP
KLF11	XhoI	BamHI	1539	IRATp970D0565D	pBSK+
KLF2	XhoI	BamHI	1068	IRAUUp969C11112D	pIRES-eGFP
KLF4	EcoRI	BamHI	1431	KLF4_pIRES-eGFP	vorhanden
KLF6	XhoI	BamHI	850	HUVEC cDNA	pIRES-eGFP
KLF9	XhoI	EcoRI	734	HUVEC cDNA	pBSK+
LMO4	XhoI	BamHI	498	HUVEC cDNA	pIRES-eGFP
MEOX2	XhoI	BamHI	914	IRATp970B1219D	pIRES-eGFP
MLLT3	EcoRI	EcoRI	1707	HUVEC cDNA	pIRES-eGFP
NFIB	XhoI	BamHI	1263	ECFC cDNA	pIRES-eGFP
PROX1	BglII	EcoRI	2214	PROX1_pIRES-eGFP	pIRES-eGFP
SIX1	XhoI	BamHI	854	ECFC cDNA	pIRES-eGFP
SMAD3	XhoI	BamHI	1277	ECFC cDNA	pIRES-eGFP
SNAI2	XhoI	BamHI	807	HUVEC cDNA	pIRES-eGFP
SOX11	XhoI	BamHI	1326	SOX11_pBSK-	pIRES-eGFP
SOX2	EcoRI	BamHI	954	SOX2_pIRES-eGFP	vorhanden
SOX4	Sall	EcoRI	1424	IRAUUp969B12110D	pBSK+
SOX9	XhoI	BamHI	1530	SOX9_pcDNA3	pBSK+
TCF19	XhoI	BglII	1038	TCF19_pDONR223	pIRES-eGFP
ZNF281	XhoI	BglII	2687	IRATp970C0565D	pBSK+
ZNF367	XhoI	BamHI	1052	IRCMp5012F1116D	pBSK+
ZNF395	XhoI	BamHI	1541	IRATp970B63	pIRES-eGFP
ZNF85	XhoI	BamHI	1787	ECFC cDNA	pBSK+
CD9	XhoI	EcoRI	705	ECFC cDNA	pIRES-eGFP
CD37a	Sall	EcoRI	870	HUVEC cDNA	pIRES-eGFP
CD37b	Sall	EcoRI	660	HUVEC cDNA	pIRES-eGFP
CD53	EcoRI	BamHI	688	CD53_pIRES-eGFP	vorhanden
CD53s	EcoRI	BamHI	589	CD53s_pIRES-eGFP	vorhanden
CD63	XhoI	EcoRI	731	CD63_pIRES-eGFP	vorhanden
CD81	XhoI	EcoRI	729	ECFC cDNA	pIRES-eGFP
CD82	XhoI	EcoRI	755	ECFC cDNA	pIRES-eGFP
CD151	XhoI	EcoRI	780	ECFC cDNA	pIRES-eGFP

Tab. 3.2: Überführung aus den primären Zielvektoren in lentivirale Expressionsplasmide.

Gen	5' Schnittstelle	3' Schnittstelle	Fragment bp	Quellvektor	Zielvektor
ARNTL2	XhoI	BamHI	1910*	pBSK+	pCL6
ARNTLa	XhoI	BamHI	1877*	pBSK+	pCL6
ARNTLb	NheI	BsrGI	1748	pIRES-eGFP	pCL6
ATF2	NheI	BsrGI	1518	pIRES-eGFP	pCL6
BHLHB2	NheI	NotI	2676	pIRES-eGFP	pCL7
CBX5	NheI	BsrGI	1931	pIRES-eGFP	pCL6
CEBPD	NheI	BsrGI	2134	pIRES-eGFP	pCL6
ELF1	XhoI	NheI	1860*	pBSK+	pCL6
FLOT1	NheI	BsrGI	1284	pIRES-eGFP	pCL6
FLOT2	NheI	BsrGI	1287	pIRES-eGFP	pCL6
FOXP1a	XhoI	BamHI	2030*	pBSK+	pCL6
FOXP1b	NheI	BsrGI	1688	pIRES-eGFP	pCL6
FUS	XhoI	BamHI	1581*	pBSK+	pCL6
HOXA5	NheI	BsrGI	2138	pIRES-eGFP	pCL6
ID3	NheI	BsrGI	1685	pIRES-eGFP	pCL6
ID4	NheI	BsrGI	1811	pIRES-eGFP	pCL6
KLF11	XhoI	BamHI	1539*	pBSK+	pCL6
KLF2	NheI	BsrGI	1068	pIRES-eGFP	pCL6
KLF4	EcoRI	BamHI	1431	pIRES-eGFP	pCL6
KLF6	NheI	BsrGI	2175	pIRES-eGFP	pCL6
KLF9	XhoI	EcoRI	734*	pBSK+	pCL6
LMO4	NheI	BsrGI	1823	pIRES-eGFP	pCL6
MEOX2	NheI	BsrGI	2239	pIRES-eGFP	pCL6
MLLT3	XhoI	BsrGI	3069	pIRES-eGFP	pCL6
NFIB	NheI	BsrGI	1263	pIRES-eGFP	pCL6
PROX1	NheI	EcoRI	2238	pIRES-eGFP	pCL6
SIX1	NheI	BsrGI	2179	pIRES-eGFP	pCL6
SMAD3	NheI	BsrGI	2602	pIRES-eGFP	pCL6
SNAI2	NheI	BsrGI	2132	pIRES-eGFP	pCL6
SOX11	NheI	BsrGI	2651	pIRES-eGFP	pCL6
SOX2	EcoRI	BamHI	2279	pIRES-eGFP	pCL6
SOX4	Sall	EcoRI	1424*	pBSK+	pCL6
SOX9	XhoI	BamHI	1530*	pBSK+	pCL6
TCF19	NheI	BsrGI	2363	pIRES-eGFP	pCL6
ZNF281	XhoI	BglII	2687*	pBSK+	pCL6
ZNF367	XhoI	BamHI	1052*	pBSK+	pCL6
ZNF395	NheI	BsrGI	2866	pIRES-eGFP	pCL6
ZNF85	XhoI	BamHI	1787*	pBSK+	pCL6
CD9	NheI	BsrGI	2030	pIRES-eGFP	pCL6
CD37a	NheI	BsrGI	2195	pIRES-eGFP	pCL6
CD37b	NheI	BsrGI	1985	pIRES-eGFP	pCL6
CD53	NheI	BsrGI	2013	pIRES-eGFP	pCL6
CD53s	NheI	BsrGI	1914	pIRES-eGFP	pCL6
CD63	NheI	BsrGI	2056	pIRES-eGFP	pCL6
CD81	NheI	BsrGI	2054	pIRES-eGFP	pCL6
CD82	NheI	BsrGI	2080	pIRES-eGFP	pCL6
CD151	NheI	BsrGI	2105	pIRES-eGFP	pCL6

Die Gene *CD9*, *CD37a*, *CD37b*, *CD81*, *CD82*, *CD151*, *ELF1*, *FLOT1*, *FLOT2*, *FOXP1b*, *FUS*, *ID3*, *ID4*, *KLF6*, *KLF9*, *LMO4*, *MLLT3*, *NFIB*, *SNAI2*, *SIX1*, *SMAD3*, und *ZNF85* wurden mittels PCR aus cDNA-Banken, die als Matrize dienten, amplifiziert und anschließend Restriktionsverdauen unterzogen. Im Anschluss wurden die verdauten Produkte in entsprechend geöffnete pIRES-eGFP-Vektoren überführt (Tab. 3.1).

Die cDNAs von *ARNTLa*, *ARNTLb*, *ARNTL2*, *ATF2*, *BHLHB2*, *CBX5*, *CEBPD*, *HOXA5*, *KLF2*, *KLF11*, *MEOX2*, *SOX4*, *SOX9*, *SOX11*, *TCF19*, *ZNF281*, *ZNF367* und *ZNF395* wurden aus Plasmiden mit entsprechenden offenen Leserastern amplifiziert (siehe Tab. 2.12). Die Gene *CD53*, *CD53s*, *CD63*, *KLF4*, *PROX1* und *SOX2* lagen der Arbeitsgruppe bereits in pIRES-eGFP-Vektoren vor und wurden lediglich in lentivirale Plasmide überführt. Im weiteren Verlauf wurden mit Hilfe von Restriktionsverdauen kodierende Fragmente isoliert und in lentivirale Plasmide überführt (Tab. 3.2).

Die Gene *ARNTLa*, *ARNTL2*, *ELF1*, *FOXP1a*, *FUS*, *KLF11*, *KLF9*, *SOX4*, *SOX9*, *ZNF85*, *ZNF281* und *ZNF367* ließen sich über die geschilderte Strategie nicht klonieren, da diese Gene die verwendeten Schnittstellen innerhalb ihres Leserasters besitzen. Andere Schnittstellen waren durch die MKS der verwendeten Plasmide limitiert. Da eine Phusion-Polymerase verwendet wurde, die glatte Enden erzeugt, konnten diese Gene direkt in die *EcoRV*-Schnittstelle des pBSK+ eingebracht werden. Darauf folgend wurden diese Gene aus dem pBSK+ in den pCL6-Vektor überführt (Tab. 3.2 mit * markiert).

Die Gene *DDIT3*, *HHEX*, *HOPX*, *ID1*, *ID1'*, *ID2* und *SOCS2* lagen schon in lentiviralen Vektoren vor. Sämtliche lentiviralen Plasmide wurden nach Fertigstellung zur Überprüfung sequenziert. Hierbei fanden sich bei folgenden Konstrukten Abweichungen von der annotierten Sequenz:

ELF1: An Position 58 befindet sich ein *single nukleotide polymorphism* SNP, der nach der Translation zu einem Aminosäureaustausch führt: Ser→Asp. Dies ist eine natürlich vorkommende Variante des Gens (Ota et al. 2004).

MEOX2: An Position 80 befindet sich ein bekannter SNP, der einen Aminosäureverlust ohne Leserasterverschiebung verursacht. (Grigoriou et al. 1995).

ID3: An Position 105 befindet sich ein bekannter SNP, der in einem Aminosäureaustausch resultiert: Thr→Ala (Ota et al. 2004).

CD151, *CD37b*, *CD82*, *FUS*, *HOXA5*, *SOX2* und *ZNF281* wiesen nicht bekannte SNPs auf, welche aber in keinem der Fälle zu einer veränderten Aminosäuresequenz führten.

CD37b ist eine annotierte Isoform (NM_001040031.1) von CD37. Dieser Variante fehlt durch alternatives Spleißen ein Segment im 5'-Bereich der kodierenden Region des Gens. Dadurch hat diese Isoform im Vergleich zur Isoform A nach der Expression einen um 68 Aminosäuren verkürzten N-Terminus. Topologisch fehlen ihr der intrazelluläre N-terminale Anteil, die komplette erste extrazelluläre Schleife sowie die beiden ersten Transmembrandomänen.

CD53s (CD53short) ist eine nicht annotierte Isoform von CD53. Diese Variante des Gens wurde durch den ehemaligen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Gregor von Levetzow nach einer PCR-Amplifikation von CD53 aus einer cDNA-Bank kloniert. Der offene Leseraster von CD53s wurde von von Levetzow in den pIRES-eGFP überführt. Mit Hilfe von Sequenzierungsreaktionen wurde CD53s hinsichtlich seiner Nukleotid- und Aminosäuresequenz analysiert. Der kodierenden Region von CD53s fehlen im Vergleich zu CD53 96 Basenpaare (Abb. 3.2). Es lag keine Leserasterverschiebung vor, so dass CD53s im Vergleich zu CD53 nach Expression ein durchgehender Abschnitt von 32 Aminosäuren innerhalb der großen extrazellulären Schleife fehlt (Abb. 3.3).

```
5' ATGGGCATGAGTAGCTTGAACCTGCTGAAGTATGTCCTGTTTTTCTTCAACTTGCTC
TTTTGGATCTGTGGCTGCTGCATTTTGGGCTTTGGGATCTACCTGCTGATCCACAACAA
CTTCGGAGTGCTCTTCCATAACCTCCCCCTCCCTCACGCTGGGCAATGTGTTTGTCAATCG
TGGGCTCTATTATCATGGTAGTTGCCTTCCTGGGCTGCATGGGCTCTATCAAGGAAAAC
AAGTGTCTGCTTATGTCGTTCTTCATCCTGCTGCTGATTATCCTCCTTGCTGAGGTGAC
CTTGGCCATCCTGCTCTTTGTATATGAACAGAAGCTGAATGAGTATGTGGCTAAGGGTC
TGACCGACAGCATCCACCGTTACCACTCAGACAATAGCACCAAGGCAGCGTGGGACTCC
ATCCAGTCATTTCTGCAGTGTTGTGGTATAAATGGCACGAGTGATTGGACCAGTGGCCC
ACCAGCATCTTGCCCTCAGATCGAAAAGTGGAGGGTTGCTATGCGAAAGCAAGACTGT
GGTTTCATTCCAATTTCTGTATATCGGAATCATCACCATCTGTGTATGTGTGATTGAG
GTGTTGGGGATGTCCTTTGCACTGACCCTGAACTGCCAGATTGACAAAACCAGCCAGAC
CATAGGGCTATGA 3'
```

Abb. 3.2: Abfolge der Nukleotidsequenz von CD53 (NM_001040033.1).

Die Abfolge der Nukleotidsequenz ist von 5' nach 3' dargestellt. Der grau unterlegte Bereich markiert die fehlenden Nukleotide der Isoform CD53s.

```
MGMSSLKLLKYVLFFFNLLFWICGCCILGFGIYLLIHNHFGVLFHNLPSLTLGNVVFVIV
GSIIMVVAFLGCMGSIKENKCLLSFFILLIILLAEVTLAILLFVYEQKLNEYVAKGL
TDSIHRYHSDNSTKAAWDSIQSFLQCCGINGTSDWTS GPPASCPSPDRKVEGCYAKARLW
FHSNFLYIGIITICVVCVIEVLGMSFALTNLNCOIDKTSOTIGL
```

Abb. 3.3: Abfolge der Aminosäuresequenz von CD53 (NM_001040033.1).

Der grau unterlegte Bereich markiert die fehlenden Aminosäuren der Isoform CD53s.

Die lentiviralen Plasmide wurden zur Herstellung von Lentiviren verwendet (siehe 2.2.5). Mit diesen Lentiviren wurden frisch isolierte CD34⁺ Zellen stabil transduziert (siehe 2.2.6). Die Plasmidkarten der verwendeten Vektoren befinden sich im Anhang.

3.3 Effekte von Transgenen auf das Entwicklungspotential von transduzierten CD34⁺ Zellen

Frisch isolierte CD34⁺ Zellen sind morphologisch klein und rund. Sie befinden sich im wesentlichen in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus. Durch Zytokinstimulation mit den früh wirkenden Zytokinen FLT3, SCF und TPO werden die Zellen aktiviert und treten in die S/G₂-Phase ein, wobei etwa 80 % der Zellen einen für Leukozyten typischen morphologischen Migrationsphänotyp mit einer Leitfront und einem Uropod erwerben (Giebel et al. 2004). Unter Zytokinstimulation mit FLT3, SCF und TPO teilen sich frisch isolierte humane CD34⁺ Zellen *in vitro* zum ersten Mal nach 48-72 stündiger Kultur, und danach alle 24 Stunden (Giebel et al. 2006; Beckmann et al. 2007).

Durch das Einbringen und die folgende stabile Expression der Kandidatengene kann die Ausbildung der Zellpolarität und die Aktivierung des Wachstums unterdrückt werden. Ebenso könnten die Zellen durch die aberante Expression apoptotisch werden. Die Größe der Zellen, sowie eine verstärkte Apoptoserate kann durchflusszytometrisch analysiert werden. Ein weiterer Effekt der stabilen Expression eingebrachter Effektoren kann ein veränderter Zellzyklus sein, so dass die Proliferationsgeschwindigkeit der manipulierten Zellen sich von der nicht-manipulierten Zellen derselben Proben unterscheidet. Dies lässt sich anhand des Verlaufs der eGFP-positiven Populationen durchflusszytometrisch ermitteln.

Eine veränderte *in vitro* Entwicklung von genetisch manipulierten CD34⁺ Zellen während der Kulturdauer von 14 Tagen kann durchflusszytometrisch ermittelt werden. Bei einem Transduktionsansatz wurde immer nur ein Teil der CD34⁺ Zellen erfolgreich transduziert, so dass entstandene Selektionsvor- oder -nachteile sich durch die Dynamik der eGFP positiven Zellpopulationen im Abgleich mit den eGFP negativen Populationen ermitteln lassen. Eine veränderte Dynamik der CD34⁺ Fraktion innerhalb der eGFP positiven Zellpopulation im Abgleich mit der eGFP negativen Population kann erste Hinweise von Auswirkungen auf die Reifung und Expansionsrate von Progenitorzellen geben. Über den Anteil an CD34⁺CD133⁺ Zellen innerhalb der eGFP⁺ und eGFP⁻ Populationen über die Zeit, lässt sich erkennen, ob die aberante Expression der Kandidatengene einen Einfluss auf die qualitative Zusammensetzung des Progenitorpools ausübt. So ist ein erhöhter Anteil von CD34⁺CD133⁺ Zellen über die Zeit ein erster Hinweis darauf, dass nun multipotente Progenitoren expandieren können oder verstärkt lymphatische Vorläufer gebildet werden. Anhand der absoluten

Zellzahlen lassen sich Aussagen über die Expansionsraten der verschiedenen Subpopulationen treffen.

Zur Analyse der Daten wurde folgende Auswertestrategie gewählt:

An Tag 0 wurden pro Ansatz 1×10^5 frisch isolierte $CD34^+$ mit den generierten Lentiviren transduziert. Die Zellen eines Ansatzes wurden an Tag 1 nach der Transduktion auf vier 24-Loch Kulturplattenvertiefungen aufgeteilt und 14 Tage kultiviert. An Tag 3, 6, 10 und 14 nach Transduktion wurden die Zellen gegen CD34 (ECD) und CD133 (PE) gefärbt und mit *Fluorospheres* versetzt. Im Anschluss wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Zunächst erfolgte ein Ausschluss von Zelldebris, Zellaggregaten und sehr granulären Zellen mit Hilfe der Streulichtparameter Größe und Granularität. Innerhalb der Region „Scatter“ befanden sich die zu analysierenden Zellen. Mit Hilfe der Region „live“ wurden Propidiumiodid gefärbte Zellen als tot definiert und von den Analysen ausgeschlossen. Im weiteren Verlauf wurden $eGFP^+$ und $eGFP^-$ Zellen voneinander diskriminiert. Diese Subpopulationen wurden bezüglich ihrer Anteile an $CD34^+$ und $CD133^+$ Zellen verglichen (Abb. 3.4 A). Mit fortschreitender Kulturdauer wurden nicht-transduzierte Zellen so stark autofluoreszent, dass sie in den Kanal zur Messung von eGFP einstrahlten, und in die $eGFP^{dim}$ Region verschoben waren. Dabei konnte nicht mehr klar zwischen autofluoreszenten Zellen und schwach $eGFP^+$ Zellen unterschieden werden. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die $eGFP^+$ und $eGFP^-$ Populationen dargestellt. Es wurden von jedem Kandidatengen drei unabhängige Versuche durchgeführt. Es wurde der arithmetische Mittelwert (MW) und die Standardabweichung vom Mittelwert (*standard error of the mean*; SEM) der eGFP, CD34, CD133 und CD34/CD133 Werte über die Zeit aufgetragen (Abb. 3.4 B). In jeder Versuchsreihe wurden zur Kontrolle Zellen mit dem *eGFP*-kodierenden pCL6 Leervektor transduziert und bei den Messungen mitgeführt.

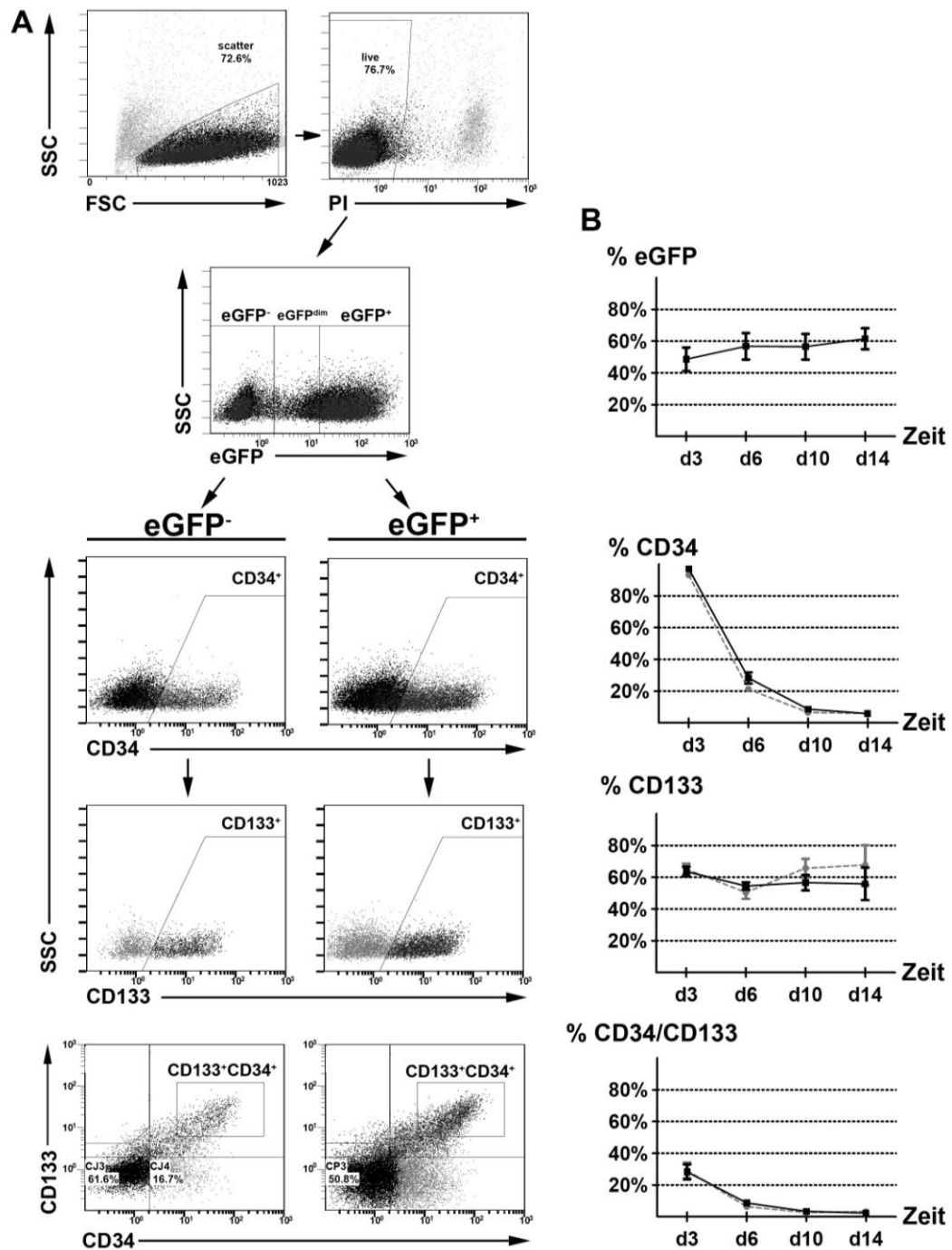


Abb. 3.4: Auswerteschema der Messwerte von stabil transduzierten CD34⁺-Zellen.

Frisch isolierte CD34⁺-Zellen wurden transduziert, kultiviert und an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transduktion durchflusszytometrisch analysiert. (A) Die abgebildeten Plots reflektieren die zur Auswertung herangezogenen Messwerte. (B) Die Kurvenverläufe geben die jeweiligen Frequenzen der positiven Zellen der einzelnen Subpopulation an. Am Beispiel von eGFP-transduzierten (schwarze Kurve) und nicht-manipulierten (graue Kurve) Zellen derselben Proben, ist der Verlauf über den Zeitraum von 14 Tagen dargestellt ($n=3$, $MW \pm SEM$).

Um Einflüsse der lentiviralen Transduktion an sich auf den Entwicklungsverlauf von CD34⁺ Zellen zu ermitteln, wurden CD34⁺ Zellen zunächst mit Lentiviren transduziert, die den leeren, eGFP kodierenden, Vektor enthielten. Die Zellen von drei unabhängigen

Versuchen wurden an den Tagen 3, 6, 10 und 14 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3.5).

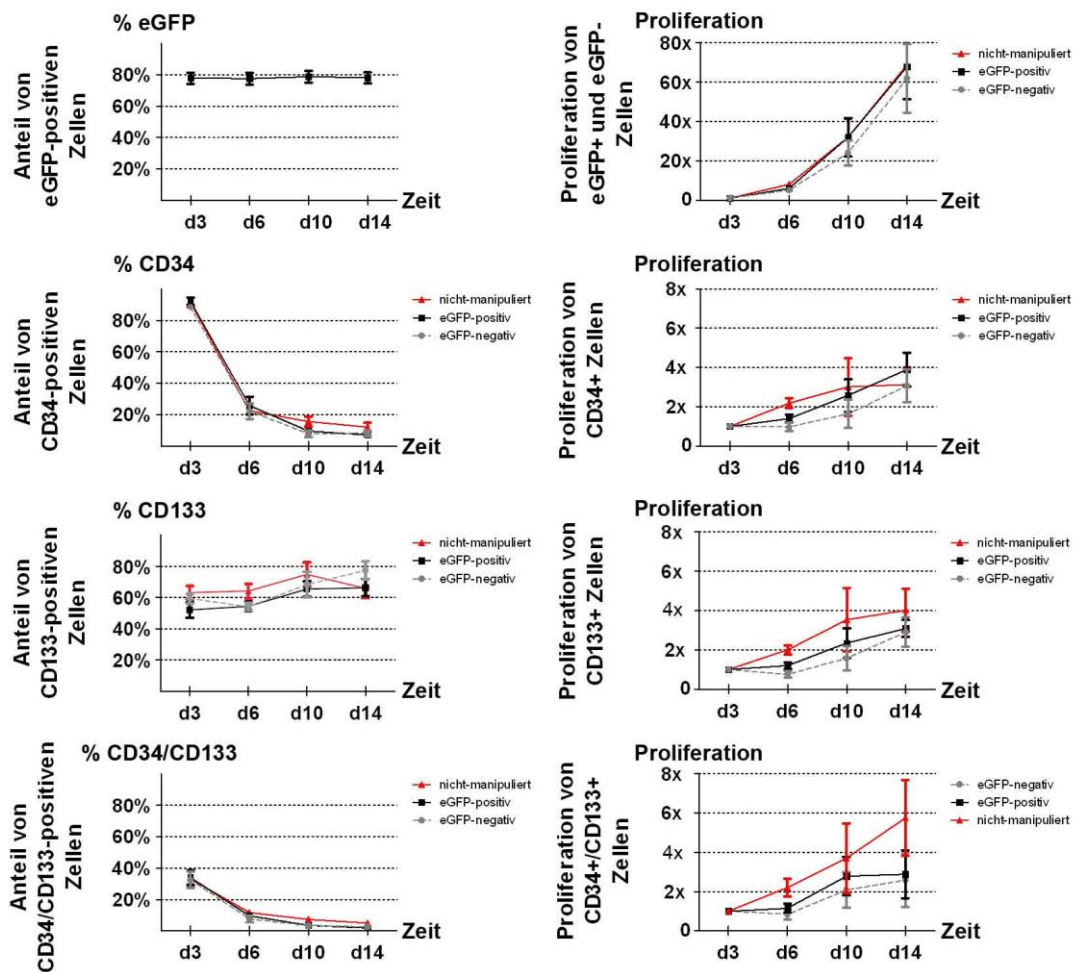


Abb. 3.5: Vergleich der Messwerte von transduzierten, nicht-transduzierten und nicht-manipulierten CD34⁺ Zellen.

Die prozentualen Werte und Veränderungen der absoluten Zellzahl von eGFP-transduzierten (schwarz), nicht-transduzierten (grau) und nicht-manipulierten (rot) CD34⁺-Zellen über einen Zeitraum von 14 Tagen ($n=3$, $MW \pm SEM$). Die Proliferation wurde aus dem Verhältnis der absoluten Zellzahl von Tag 6, 10 und 14 zu den absoluten Zellzahlen von Tag 3 bestimmt.

Die Populationsdynamiken der eGFP⁺, CD34⁺, CD133⁺ und CD34/CD133 Populationen von eGFP-kodierenden Leervektor transduzierten Zellen entsprachen denen von nicht-transduzierten Zellen derselben Proben, sowie nicht-manipulierten Zellen derselben Versuchsreihe. Die Proliferationsraten der betrachteten Populationen waren leicht unterschiedlich. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Methode der lentiviralen Transduktion mit einer Transduktionseffizienz von etwa 80% keinen erkennbaren Einfluss auf die Populationsdynamik transduzierter CD34⁺ Zellen hat.

Bei einigen Effektoren fand sich nach erfolgter Transduktion und Kultivierung der Zellen nur ein sehr geringer Anteil $eGFP^+$ Zellen. Hierzu gehörten die Ansätze mit den Kandidatengenenen *ATF2*, *ARNTLa*, *ARNTLb*, *ARNTL2*, *ELF1*, *FOXP1a*, *KLF10*, *LMO4*, *NFIB*, *PROX1* und *ZNF85* (Abb. 3.6).

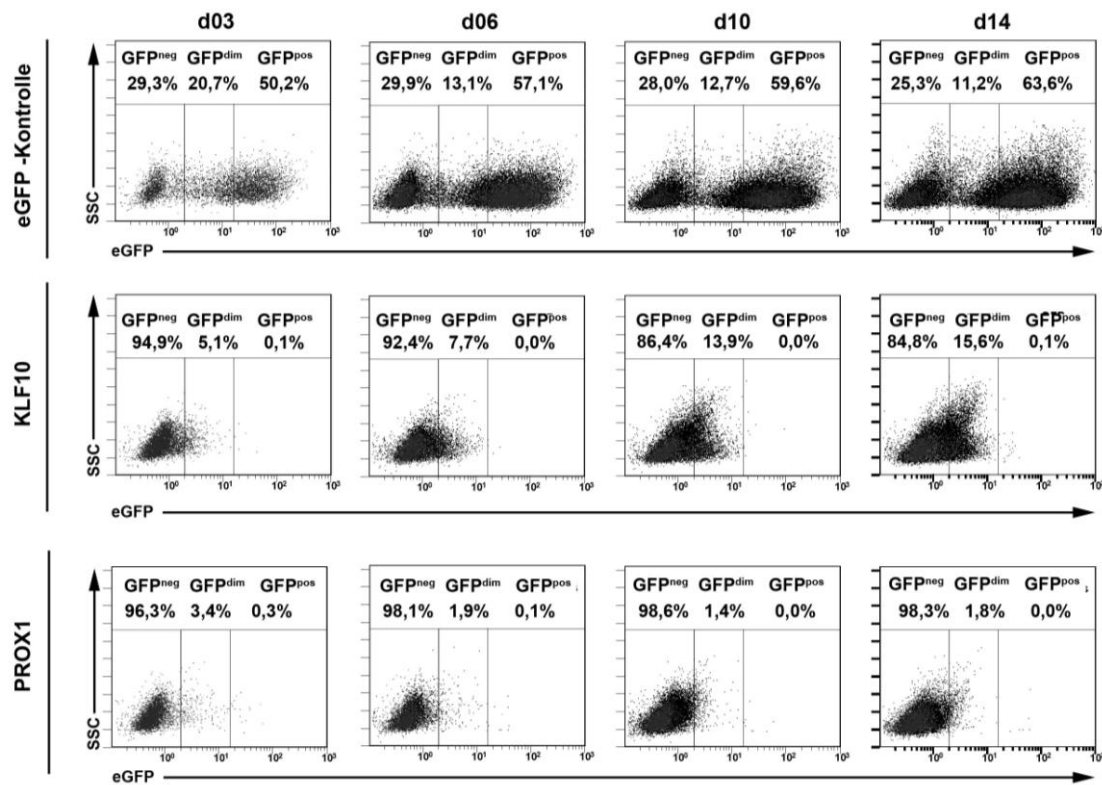


Abb. 3.6: Ansätze ohne diskriminierbare $eGFP^+$ Population.

In den $eGFP$ Kontrollansätzen ist eine erfolgreich transduzierte Population von $eGFP^+$ Zellen sowie nicht-transduzierte $eGFP^-$ Zellen zu erkennen. Exemplarisch für Versuche in denen Zellen nach Applikation der lentiviralen Überstände keine $eGFP^+$ Population aufweisen, sind hier Ansätze von *KLF10* und *PROX1* dargestellt.

Bei diesen Ansätzen waren, mutmaßlich aufgrund einer schlechten Transduktionseffizienz, keine $eGFP^+$ Populationen vorhanden. Die versuche wurden zwei Mal wiederholt, mit den gleichen Ergebnissen. Zur Analyse der $eGFP^{dim}$ Population hätten die Zellen an Tag 2 durchflusszytometrisch sortiert werden können, von dieser Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit abgesehen.

Nach der Transduktion von $CD34^+$ Zellen mit Kandidatengenenen waren im Abgleich mit den Kontrollen über die Zeit in einigen Ansätzen veränderte Dynamiken der $eGFP^+$, $CD34^+$, $CD133^+$ und $CD34/CD133$ Populationen zu beobachten. Beispielhaft sind

Veränderungen in der Dynamik dieser Populationen in den Abbildungen 3.7 bis 3.8 dargestellt.

Zunächst wurde die Qualität und Quantität der Zellen mikroskopisch betrachtet (Abb. 3.7 A). Nun wurde der Anteil von eGFP positiven Zellen in der Gesamtpopulation protokolliert (Abb. 3.7 B+C)

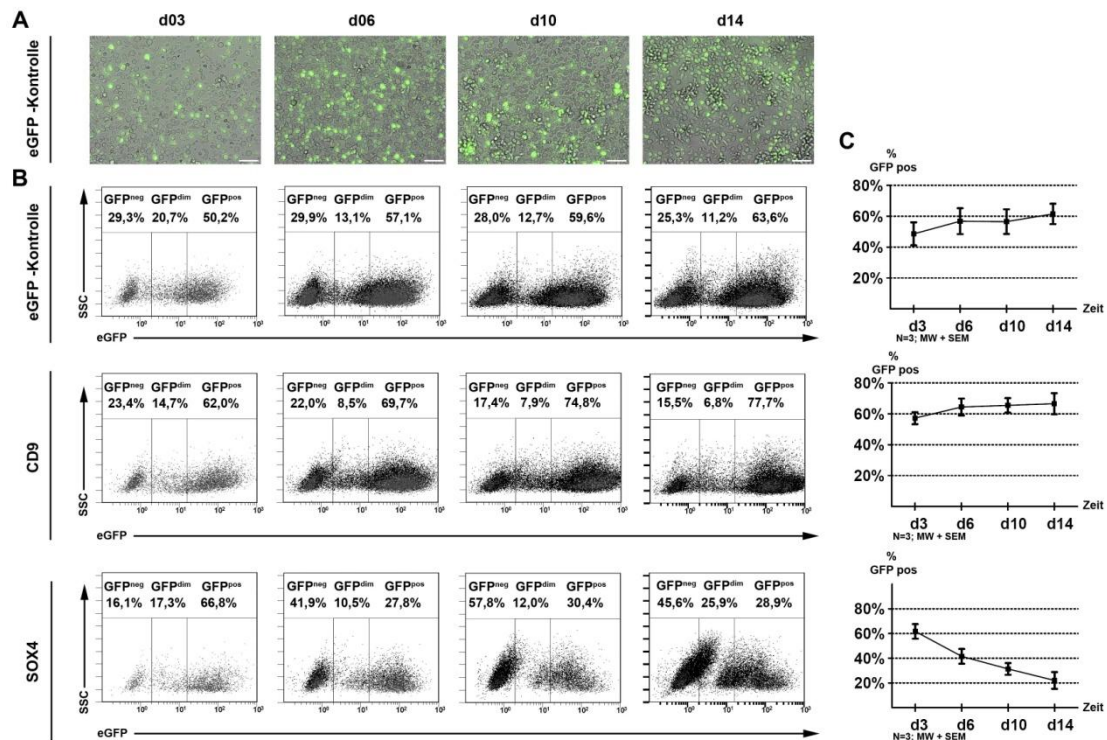


Abb. 3.7: Anteile an eGFP⁺ und eGFP⁻ Zellen an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transduktion.

(A) Darstellung der transduzierten und nicht-transduzierten Zellen an verschiedenen Messtagen (Maßstabsbalken: 50 μ m). (B) Darstellung unterschiedlicher Verläufe der eGFP⁺ Population, exemplarisch an eGFP, CD9 und SOX4 transduzierten Zellen. (C) Anteil an eGFP⁺ Zellen aus drei unabhängigen Versuchen an jedem Messtag ($n=3$, MW \pm SEM).

CD34⁺ Zellen erwerben unter den verwendeten Kulturbedingungen innerhalb der ersten zwei Tage einen charakteristischen morphologischen Phänotyp: am vorderen Pol der Zelle bildet sich die Leitfront, am hinteren Ende eine Struktur, die als Uropod bezeichnet wird (Giebel et al. 2004). Bei den lichtmikroskopischen Analysen wiesen nur zwei Ansätze deutliche morphologische Unterschiede auf. Alle SOX2 und KLF4 transduzierten Zellen blieben über die gesamte Kulturdauer klein und rund. In den Ansätzen, die mit CD53 transduziert waren, fanden sich vermehrt Zelldebris und tote Zellen. Lebende Zellen wiesen jedoch keinen Unterschied zu den Kontrollen auf.

Bezüglich des Anteils an transduzierten eGFP⁺ Zellen der Ansätze wurden zwei Effekte beobachtet, die zur Übersicht in drei Gruppen unterteilt wurden (Tab. 3.3). Die erste Gruppe umfasst Kandidatengene, bei denen nach Transduktion der Anteil an eGFP⁺ Zellen über die Zeit konstant blieb. Die zweite Gruppe umfasst Kandidatengene, bei denen nach Transduktion der Anteil an eGFP⁺ Zellen über die Zeit geringer wurde. CD34⁺ Zellen, die mit dem *eGFP* kodierenden Leervektor transduziert waren, wiesen über die Zeit einen konstanten Anteil eGFP⁺ Zellen auf. Ein repräsentatives Beispiel für einen konstanten Anteil an eGFP⁺ Zellen über die Zeit innerhalb der Gesamtpopulation stellt der Verlauf von *CD9* transduzierten Zellen dar. Ein typischer Verlauf von transduzierten Zellen, deren Anteil an der Gesamtpopulation abnahm, waren *KLF4* transduzierte Zellen (Abb. 3.7).

Tab. 3.3: Zuordnung der Kandidatengene bezüglich des Anteils an eGFP⁺ Zellen.

Gruppe 2 (%eGFP konstant)	Gruppe 1 (%eGFP abnehmend)	Gruppe 3 (%eGFP zunehmend)
CD9, CD37a, CD37b, CD53, CD53s, CD63, CD81, CD82, CD151, FOXP1b, FUS, MEOX2, SNAI2, TCF19	BHLHB2, CBX5, CEBPD, DDIT3, FLOT1, FLOT2, HHEX, HOPX, HOXA5, ID1, ID1', ID2, ID3, ID4, KLF2, KLF4, KLF6, KLF9, KLF11, MLLT3, SIX1, SMAD3, SOCS2, SOX2, SOX4, SOX9, SOX11, ZNF281, ZNF367, ZNF395	n.v.

Im weiteren Verlauf wurde die Frequenz von $CD34^+$ Zellen in der Subpopulationen der $eGFP^+$ Zellen betrachtet (Abb. 3.8 A+B).

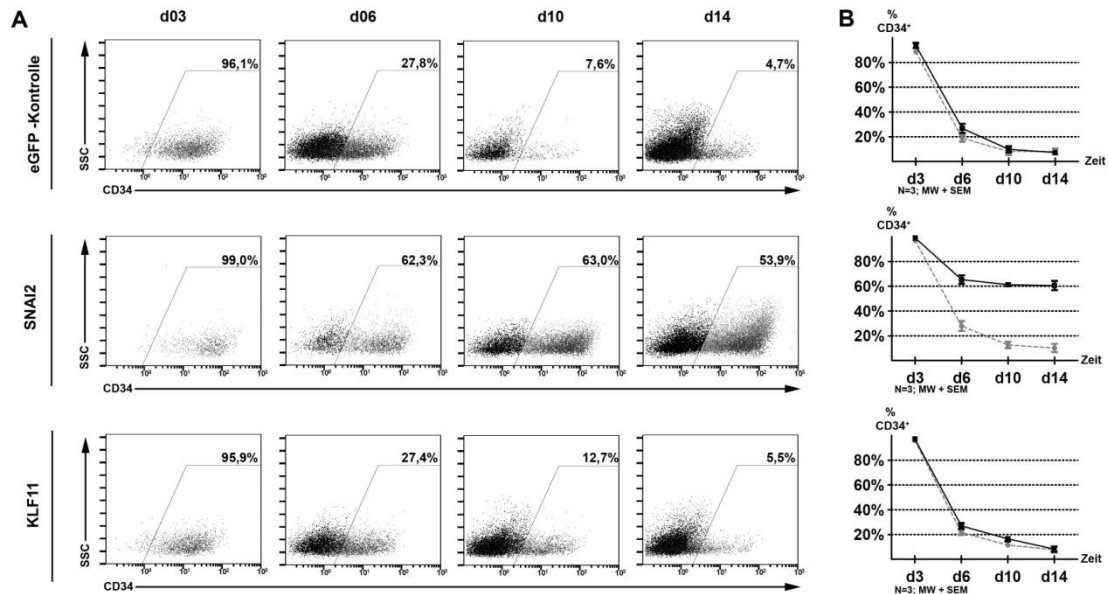


Abb. 3.8: Anteile der $CD34^+$ Zellen der eGFP-Subpopulationen an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transduktion.

(A) Darstellung des Verlaufs an eGFP-, SNAI2- und KLF11 transduzierten Zellen, die exemplarisch als Beispiel für die aufgetretenen Szenarien gezeigt sind. (B) Anteile der $CD34^+$ Zellen von transduzierten (schwarze Kurve), sowie nicht-transduzierten Zellen (graue Kurve) derselben Proben an jedem Messtag ($n=3$, $MW \pm SEM$).

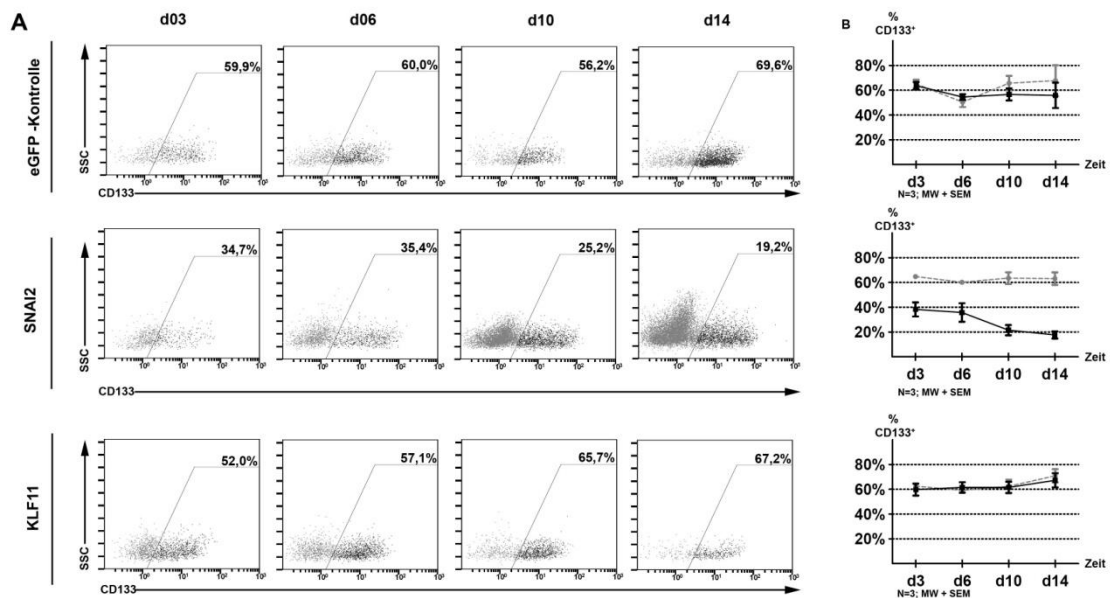
Erfolgreich mit Effektoren transduzierte Zellen konnten bezüglich der Frequenz von $CD34^+$ Zellen, in drei Klassen unterteilt werden. Diese sind in Tabelle 3.4 aufgelistet.

Gene wurden der ersten Gruppe zugeordnet, deren Überexpression keinen Einfluss auf die Dynamik der $CD34^+$ Population aufwiesen. Wie bei den Kontrollen, nahm der Gehalt an $CD34^+$ Zellen, die mit Genen dieser Gruppe transduziert waren, ab. Gene deren Überexpression eine stärkere Abnahme der $CD34^+$ Population über die Zeit bewirkten, wurden der Gruppe 2 zugeordnet. Ansätze mit Kandidatengenen, bei denen der Anteil an $CD34^+$ Zellen über die Zeit höher war, wurden der Gruppe 3 zugeordnet. Der Anteil der $CD34^+$ Fraktion von Zellen, die mit dem eGFP kodierenden Leervektor transduziert waren, nahm über die Zeit ab. Exemplarisch ist die Populationsdynamik der $CD34^+$ Zellen von SNAI2 und KLF11 transduzierten Zellen gezeigt. Die Frequenz der $CD34^+$ Zellen der $eGFP^+$ Population war in SNAI2 transduzierten Zellen über den gesamten Zeitraum relativ hoch, wohingegen sich der Anteil von $CD34^+$ Zellen der $eGFP^+$ Population von KLF11 transduzierten Zellen verringerte (Abb. 3.8).

Tab. 3.4: Zuordnung der Kandidatengene bezüglich des Anteils an CD34⁺ Zellen.

Gruppe 1 (% CD34 unverändert)	Gruppe 2 (% CD34 abnehmend)	Gruppe 3 (% CD34 zunehmend)
BHLHB2, CBX5, CD9, CD37a, CD37b, CD81, DDIT3, FLOT1, FLOT2, FOXP1b, FUS, HHEX, HOXA5, ID1', ID3, ID4, KLF2, KLF9, KLF11, MLLT3, SIX1, SMAD3, SOCS2, TCF19, ZNF281, ZNF367, ZNF395	CD53, CD53s, CD82, CD151, CD63, CEBPD, HOPX, ID1, ID2, KLF4, KLF6, MEOX2,	SNAI2, SOX2, SOX4, SOX9, SOX11

Von der eGFP⁺CD34⁺ Subpopulationen wurde der Anteil an CD133 positiven Zellen betrachtet (Abb. 3.9 A+B).

**Abb. 3.9:** Anteile der CD133⁺ Zellen innerhalb der eGFP⁺CD34⁺ und eGFP⁻CD34⁺ Subpopulationen an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transduktion.

(A) Darstellung des Verlaufs an eGFP-, SNAI2- und KLF11 transduzierten Zellen, die exemplarisch als Beispiel für die aufgetretenen Szenarien gezeigt sind. (B) Anteile der CD34⁺ Zellen von transduzierten (schwarze Kurve), sowie nicht-transduzierten Zellen (graue Kurve) derselben Proben an jedem Messtag (n=3, MW ± SEM).

Erfolgreich mit Effektoren transduzierte Zellen konnten bezüglich der Frequenz von CD133⁺ Zellen, in drei Klassen unterteilt werden. Diese drei Klassen der verschiedenen Ansätze sind in Tabelle 3.5 aufgelistet.

Der ersten Gruppe wurden Kandidatengene zugeordnet, die nach ihrer Überexpression keinen veränderten Anteil an CD133⁺ Zellen innerhalb der betrachteten eGFP⁺CD34⁺ Subpopulation über die Zeit aufwiesen. In der zweiten Gruppe sind Kandidatengene, welche nach ihrer Überexpression eine Abnahme des Anteils an CD133⁺ Zellen innerhalb der eGFP⁺CD34⁺ Subpopulation über die Zeit aufwiesen. In der dritten Gruppe sind Kandidatengene, die nach ihrer Überexpression einen höheren Anteil an CD133⁺ Zellen innerhalb der eGFP⁺CD34⁺ Subpopulation über die Zeit aufwiesen. Die eGFP⁺CD34⁺ Population von Zellen die mit dem *eGFP* kodierenden Leervektor transduziert waren, wiesen über die Zeit einen konstanten Anteil an CD133⁺ Zellen auf. Der Anteil an CD133⁺ Zellen der eGFP⁺CD34⁺ Subpopulation von *KLF11* transduzierten Zellen, die hier repräsentativ gezeigt sind, blieb über die Zeit konstant. An dem Beispiel von *SNAI2* transduzierten Zellen ist hier eine abweichende Dynamik der CD133⁺ Population dargestellt. Die *SNAI2* transduzierten Zellen haben im Abgleich mit den Kontrollen vom ersten Messtag an einen geringeren Anteil an CD133⁺ Zellen, der über die Zeit weiter abnimmt.

Tab. 3.5: Zuordnung der Kandidatengene bezüglich des Anteils an CD133⁺ Zellen.

Gruppe 1 (% CD133 unverändert)	Gruppe 2 (% CD133 abnehmend)	Gruppe 3 (% CD133 zunehmend)
DDIT3, FLOT1, FLOT2, FUS, HHEX, HOPX, KLF2, MLLT3, MEOX2, SIX1, SMAD3, SOCS2, TCF19, ZNF367, ZNF395	BHLHB2, CBX5, CEBPD, ID1, ID1', ID2, ID3, ID4, HOXA5, KLF4, SNAI2, SOX2, SOX4, SOX9, SOX11, ZNF281, ZNF367	CD9, CD37a, CD37b, CD63, CD81, CD82, CD151, FOXP1b, HOXA5, KLF6, KLF9, KLF11

Weiterhin wurde die Dynamik der $eGFP^+$ Zellen, die innerhalb der definierten Region „CD34/CD133“ lagen, über die Zeit betrachtet (Abb. 3.10 A+B).

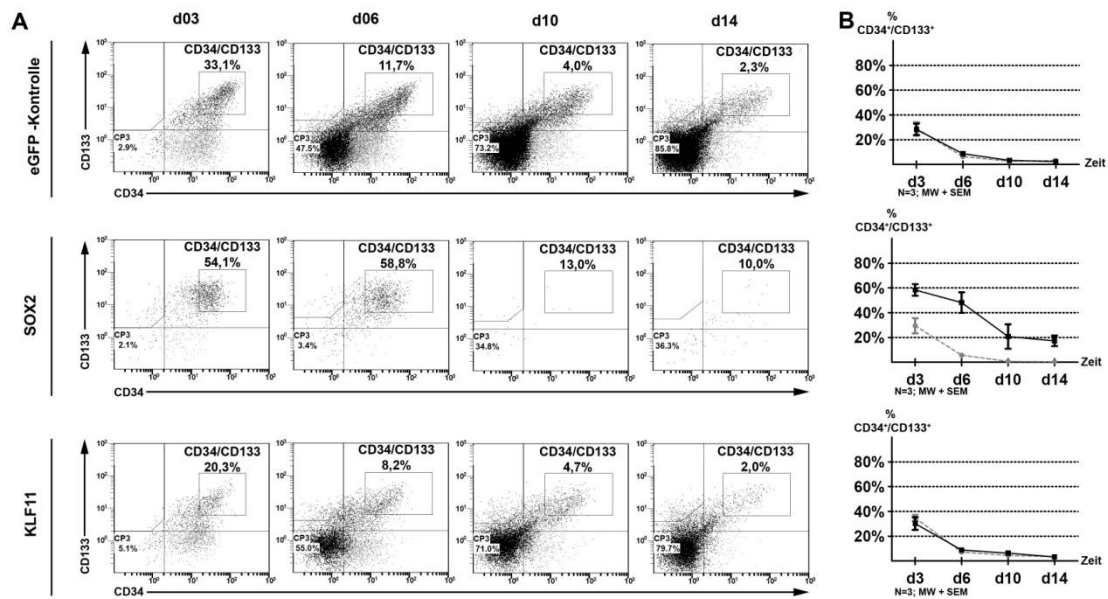


Abb. 3.10: Anteile der $CD133^+CD34^+$ -Zellen der $eGFP^+$ und $eGFP^-$ Subpopulationen an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transduktion.

(A) Darstellung des Verlaufs an $eGFP^-$, $SOX2^-$ und $KLF11^-$ transduzierten Zellen. (B) Die Kurvenverläufe stellen die jeweiligen Anteile der $CD133/CD34$ positiven Zellen an den Beispielen von $eGFP$, $SOX2$ und $KLF11$ transduzierten Zellen (schwarze Kurve), sowie nicht-transduzierten Zellen (graue Kurve) derselben Proben, dar ($n=3$, $MW \pm SEM$).

Zellen die erfolgreich mit Kandidatengenen transduziert waren, wiesen über die Zeit im Abgleich mit den Kontrollen drei unterschiedliche Klassen bezüglich der $CD34/CD133$ Population auf. Diese unterschiedlichen Klassen der verschiedenen Ansätze sind in Tabelle 3.6 aufgelistet.

So wurden Gene der ersten Gruppe zugeordnet, deren Überexpression keinen Einfluss auf die Dynamik der $CD34/CD133$ Population aufwiesen. Gene deren Überexpression eine Abnahme der $CD34/CD133$ Population über die Zeit bewirkten, wurden der Gruppe 2 zugeordnet. Ansätze mit Kandidatengenen, bei denen der Anteil an $CD34/CD133$ Zellen über die Zeit höher war als bei den Kontrollen, wurden der Gruppe 3 zugeordnet. Ansätze, die mit dem $eGFP$ kodierenden Leervektor transduziert waren, wiesen über die Zeit eine Abnahme von Zellen innerhalb der $CD34/CD133$ Region auf. Exemplarisch sind zwei Beispiele von Kandidatengenen gezeigt. $SOX2$ transduzierte Zellen wiesen über die Zeit einen erhöhten Anteil an $CD34/CD133$ Zellen auf. $KLF11$

transduzierte Zellen wiesen über die Zeit eine Abnahme des Anteils an CD34/CD133 Zellen auf (Abb. 3.10).

Tab. 3.6: Zuordnung der Kandidatengene bezüglich des Anteils an CD34/CD133 Zellen.

Gruppe 1 (% CD34/CD133 unverändert)	Gruppe 2 (% CD34/CD133 abnehmend)	Gruppe 3 (% CD34/CD133 zunehmend)
BHLHB2, CD9, CD37a, CD37b, CD53, CD53s, CD63, CD81, CD82, CD151, CEBPD, DDIT3, FLOT1, FLOT2, FOXP1b, FUS, HHEX, HOPX, HOXA5, ID1, ID1', ID2, ID3, ID4, KLF2, KLF6, KLF9, KLF11, MLLT3, MEOX2, SIX1, SMAD3, SOCS2, TCF19, ZNF367, ZNF395	CBX5, KLF4, SNAI2, ZNF281	SOX2, SOX4, SOX9, SOX11,

Einige Ansätze wiesen im Abgleich mit den Kontrollen nur an einzelnen Tagen einen unterschiedlichen Anteil einzelner Subpopulationen auf. So hatten z.B. Zellen, die mit *KLF6* und *KLF9* transduziert waren, nur an Tag 6 einen deutlich geringeren Anteil an CD34⁺ Zellen als die Kontrollen. Der Anteil an CD133⁺ Zellen dieser Ansätze war nur an Tag 10 und Tag 14 höher als bei den Kontrollen (Tab. 3.7).

Aus diesen Gründen wird im Folgenden eine vereinfachte Übersicht über die erhobenen Daten dargestellt, die es ermöglicht den Verlauf der Dynamiken der CD34- und CD133- Populationen mühelos nachzuvollziehen. Hierfür wurden die Anteile an CD34⁺ und CD133⁺ Zellen von von erfolgreich transduzierten Zellen (eGFP⁺) mit den Kontrollwerten abgeglichen. Hierzu wurden Quotienten aus den Mittelwerten der betrachteten Populationen der Experimente und den Mittelwerten dieser Populationen von den Kontrollansätzen (Leervektor) gebildet. Die errechneten Quotienten sind in Punktwolkendarstellungen für jeden Messtag zusammengefasst (Abb. 3.11 und 3.12). Die einzelnen Werte sind in Tabelle 3.7 aufgelistet.

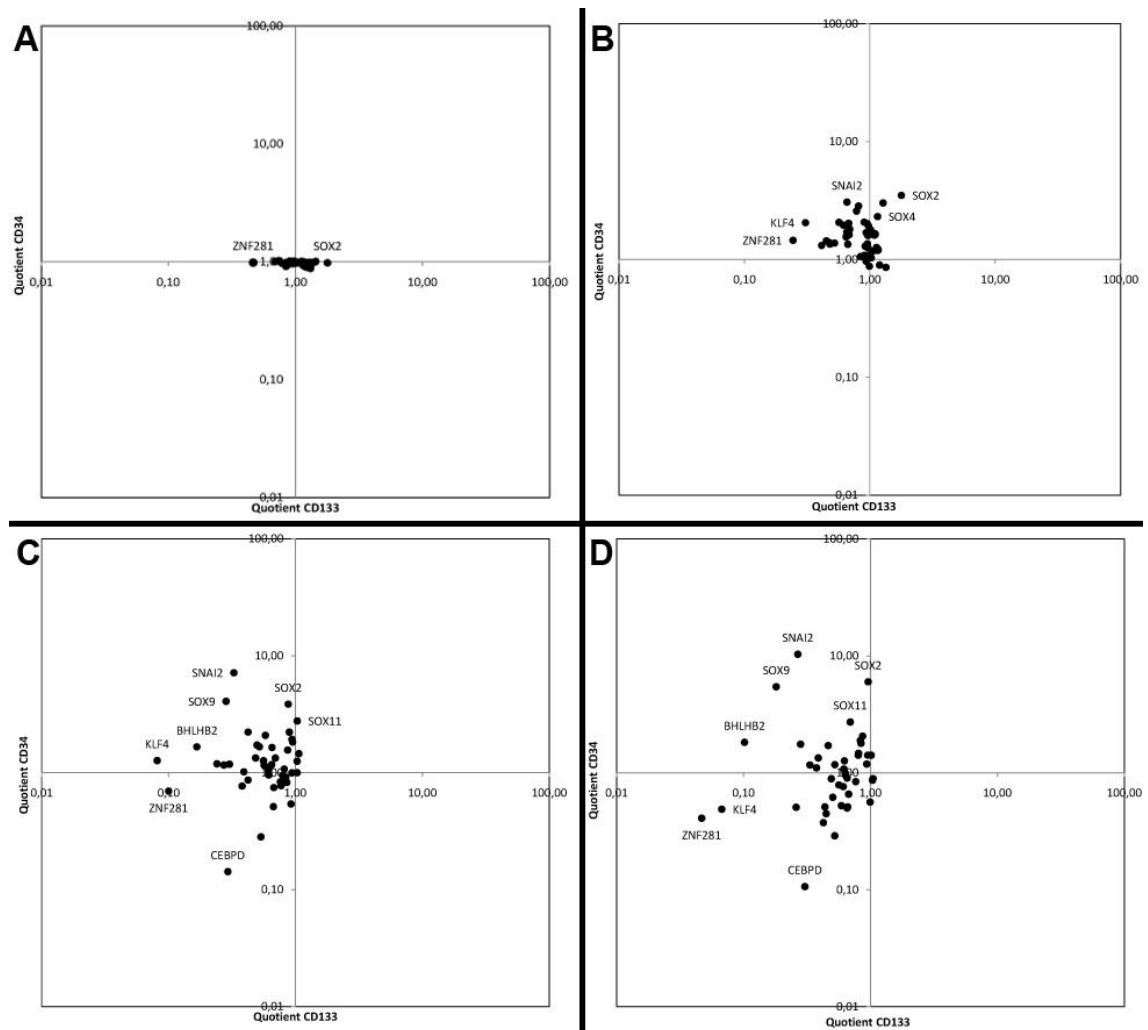


Abb. 3.11: Effekte der Transgene auf den Anteil der CD34 und CD133 positiven Zellen innerhalb der eGFP⁺ Population im Vergleich zu den Kontrollen.

A: Tag 3; B: Tag 6; C: Tag 10; D: Tag 14. Jeder Punkt stellt das Verhältnis der Versuche zu Kontrollwerten jeweils von drei unabhängigen Versuchen dar. Die Achsen sind logarithmisch skaliert. Je weiter ein Datenpunkt vom Kreuzpunkt entfernt ist, desto größer sind die Abweichungen der Kandidatengen-Werte von den Werten der Kontrollen.

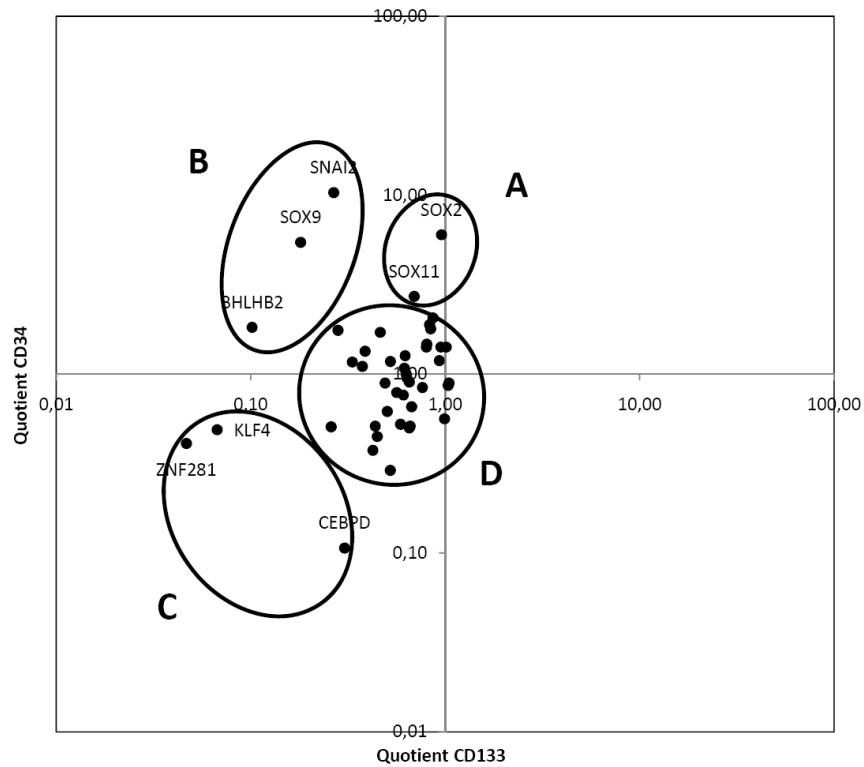


Abb. 3.12: Effekte der Transgene auf den Anteil der CD34 und CD133 positiven Zellen innerhalb der eGFP⁺ Population im Vergleich zu den Kontrollen an Tag 14.

Bis zu Tag 14 wurden die immunphänotypischen Veränderungen in vier Gruppen (A, B, C und D) eingeteilt.

Tabelle 3.7: Effekte der Transgene auf den Anteil der CD34 und CD133 positiven Zellen innerhalb der eGFP⁺-Population im Vergleich zu den Kontrollen.

Die bedingte Formatierung der errechneten Werte markiert je nach Farbintensität Abweichungen vom Durschnitt. Dabei sind Werte, die in Grüntönen unterlegt sind, höher und Werte die Rottönen unterlegt sind, niedriger als der Durchschnitt (gelb).

Gruppe	Gen	d03		d06		d10		d14	
		Quotient133	Quotient34	Quotient133	Quotient34	Quotient133	Quotient34	Quotient133	Quotient34
A	SOX2	1,788	0,981	1,786	3,499	0,877	3,861	0,958	6,004
	SOX11	1,445	1,007	1,275	3,014	1,034	2,774	0,693	2,719
B	BHLHB2	1,291	0,987	0,568	2,064	0,167	1,666	0,102	1,824
	SNAI2	0,735	1,020	0,657	3,067	0,328	7,160	0,267	10,335
	SOX9	1,271	0,988	0,813	2,842	0,284	4,083	0,181	5,446
C	CEBPD	1,013	0,983	0,413	1,316	0,293	0,143	0,304	0,107
	KLF4	1,176	0,976	0,307	2,052	0,081	1,272	0,067	0,489
	ZNF281	0,465	0,984	0,244	1,455	0,100	0,696	0,047	0,409
D	CBX5	0,947	0,965	0,686	1,623	0,302	1,183	0,259	0,507
	CD151	1,156	0,928	0,978	1,072	0,855	0,829	0,764	0,841
	CD37a	1,225	0,952	1,152	1,208	1,064	1,459	0,866	2,063
	CD37b	1,220	0,900	0,910	1,086	0,793	0,948	0,801	1,415
	CD53	1,314	0,877	0,932	0,968	0,534	0,283	0,523	0,290
	CD53s	1,317	0,919	1,026	1,034	0,677	0,747	0,661	0,511
	CD63	1,147	0,942	0,843	1,059	0,670	0,514	0,654	0,500
	CD81	1,172	0,944	1,049	1,171	0,940	0,998	0,950	1,415
	CD82	1,167	0,921	1,196	0,896	1,032	1,001	1,037	0,864
	CD9	1,186	0,962	0,970	1,252	0,816	1,077	0,831	1,886
	DDIT3	0,890	0,959	0,614	1,958	0,486	1,339	0,563	0,788
	FLOT1	1,095	0,974	0,936	1,689	0,694	1,335	0,654	0,903
	FLOT2	1,108	0,977	0,962	1,656	0,561	1,268	0,636	0,955
	FOXP1b	0,982	0,982	1,017	1,778	0,868	1,564	0,843	1,790
	FUS	0,861	0,967	0,920	1,295	0,649	1,173	0,805	1,472
	HHEX	0,903	0,995	0,692	1,807	0,498	1,724	0,281	1,756
	HOPX	0,694	1,005	0,667	1,346	0,611	1,062	0,504	0,618
	HOXA5	1,113	0,997	1,089	1,636	0,950	1,829	0,933	1,189
	ID1	0,834	0,966	0,475	1,391	0,380	0,770	0,491	0,891
	ID1'	0,974	1,012	0,647	1,556	0,520	1,669	0,523	1,176
	ID2	0,836	0,982	0,480	1,349	0,392	1,019	0,437	0,511
	ID3	0,940	0,972	0,523	1,378	0,423	0,867	0,632	0,997
	ID4	0,786	0,973	0,450	1,438	0,273	1,164	0,388	1,342
	KLF11	1,149	1,001	1,131	1,266	0,938	1,930	1,013	1,415
	KLF2	0,994	1,004	0,667	1,600	0,580	2,089	0,464	1,710
	KLF6	1,003	0,977	0,993	0,877	0,923	0,541	0,992	0,563
	KLF9	1,232	0,975	1,345	0,858	1,031	1,253	1,046	0,892
	MEOX2	0,987	0,988	0,957	1,357	0,772	0,774	0,590	0,524
	MLLT3	0,843	0,915	0,655	1,712	0,241	1,194	0,333	1,168
	SIX1	1,118	1,007	0,954	2,014	0,654	1,646	0,617	1,078
	SMAD3	0,995	0,970	0,965	1,598	0,838	0,918	0,673	0,656
	SOCS2	1,194	0,988	0,903	2,074	0,566	1,160	0,425	0,375
	SOX4	1,429	1,000	1,153	2,313	0,895	2,226	0,610	0,763
	SOX9	1,271	0,988	0,813	2,842	0,284	4,083	0,181	5,446
	TCF19	1,321	0,987	0,975	1,932	0,761	0,837	0,447	0,447
	ZNF367	1,035	0,993	0,784	2,573	0,424	2,230	0,375	1,104
	ZNF395	1,169	0,995	0,678	2,027	0,617	0,957	0,623	1,266

Nach der Transduktion von frisch isolierten CD34⁺ Zellen mit ausgewählten Kandidatengenen, waren veränderte Dynamiken in den CD34⁺ und CD133⁺ Populationen dieser Zellen über die Zeit im Abgleich mit den Kontrollen beobachtbar. Diese veränderten Populationsdynamiken wurden in vier Gruppen unterteilt.

Dabei wurden Ansätze mit Genen, deren Werte sich über die Zeit oder nur an einzelnen Messtagen nicht stark von den Werten der Kontrollen unterschieden, der Gruppe D zugeteilt. Ansätze mit Genen, deren Werte deutlich und während aller Messtage von den Kontrollen abwichen, wurden in die Gruppen A, B und C unterteilt, je nachdem in welcher Weise die Dynamik der Populationen abweichend war bzw. in welchem Quadranten der Punktwolkendarstellung sie sich befanden. In der Gruppe A sind die Ansätze zusammengefasst, bei denen die transduzierten Zellen über die Zeit einen erhöhten Anteil an CD34⁺ sowie CD133⁺ Zellen aufwiesen. In der Gruppe B befinden sich die Ansätze, bei denen die transduzierten Zellen über die Zeit einen erhöhten Anteil an CD34⁺, nicht aber an CD133⁺ Zellen aufwiesen. Der Gruppe C wurden Ansätze zugewiesen, bei denen die transduzierten Zellen über die Zeit einen stark verringerten Anteil an CD34⁺ und CD133⁺ Zellen aufwiesen.

Der Anteil an CD34⁺ Zellen von *SNAI2*, *SOX2*, *SOX9* und *SOX11* transduzierten Zellen war über die gesamte Zeit wesentlich höher als bei den Kontrollen. Dabei war der Anteil der CD133⁺ Zellen bei *SNAI2* und *SOX9* transduzierten Zellen an den Tagen 3, 6, 10 und 14 verringert. Zellen die mit *CEBPD*, *KLF4* oder *ZNF281* transduziert waren, hatten über die Zeit sowohl einen verminderten CD34⁺ als auch einen verminderten CD133⁺ Anteil innerhalb der eGFP⁺ Population. Alle übrigen Daten der durchgeführten Experimente befinden sich im Anhang.

Zur Quantifizierung der in Kultur vorhandenen Zellen wurde ihre Anzahl mit Hilfe von kleinen fluoreszenten Partikeln (*Fluorospheres*), die vor der Messung hinzugegeben wurden, ermittelt. Um zu bestimmen, ob die Expansion der unterschiedlichen Populationen effektorspezifisch verändert war, wurden zunächst Quotienten aus der Anzahl der Zellen der betrachteten Populationen von Tag 3 und Tag 14 gebildet. Durch den Vergleich dieser Werte mit denen der Kontrollen, können Aussagen über einen Effekt der Kandidatengene auf die Proliferation der Zellpopulationen getroffen werden. 14 Tage nach der Transduktion waren individuelle Unterschiede der Populationen am deutlichsten zu erkennen. Auf diese Weise läßt sich darstellen, ob die eine oder andere Population sich quantitativ stärker vermehrt oder verringert. Erzielte Effekte sollten sich damit quantifizieren und untereinander vergleichen lassen. Die ermittelten Expansionsraten sind in den folgenden Abbildungen 3.13 bis 3.18 dargestellt. Eine Tabelle mit sämtlichen P-Werten der Signifikanzberechnungen (T-Test, zweiseitig, gepaart) befindet sich im Anhang.

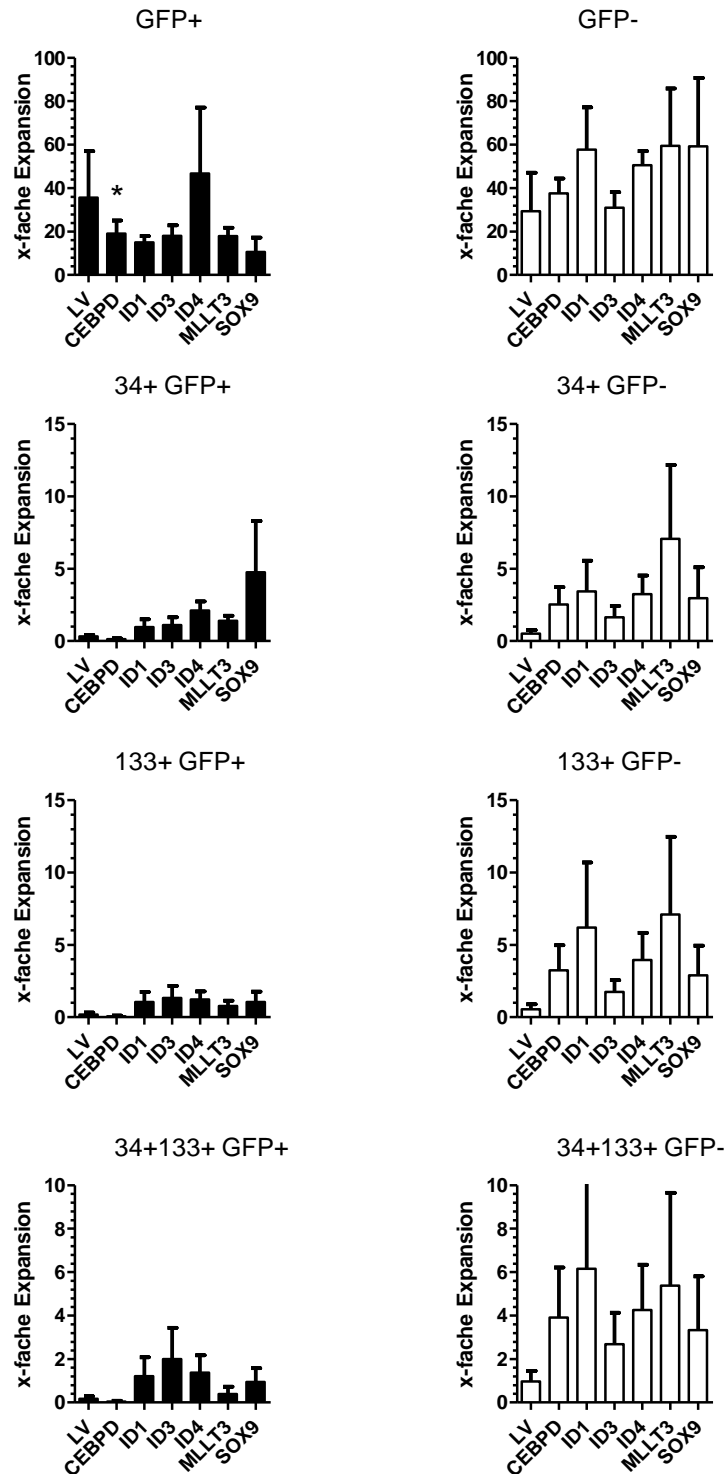


Abb. 3.13: Expansionsraten von Tag 3 zu Tag 14 der analysierten Populationen von manipulierten und nicht-manipulierten Zellen.

Aufgrund von interindividuellen Schwankungen der verwendeten Nabelschnurrestblute sind jeweils die Werte entsprechender Leervektor-Kontrollansätze (LV) zum Abgleich herangezogen worden. Angegeben ist jeweils der Mittelwert und SEM von 4 unabhängigen Versuchen. ° = Signifikanzberechnung im Vergleich zur internen Kontrolle, * = Signifikanzberechnung im Vergleich zur Leervektor Kontrolle (T-Test, zweiseitig, gepaart; $p \leq 0,05$).

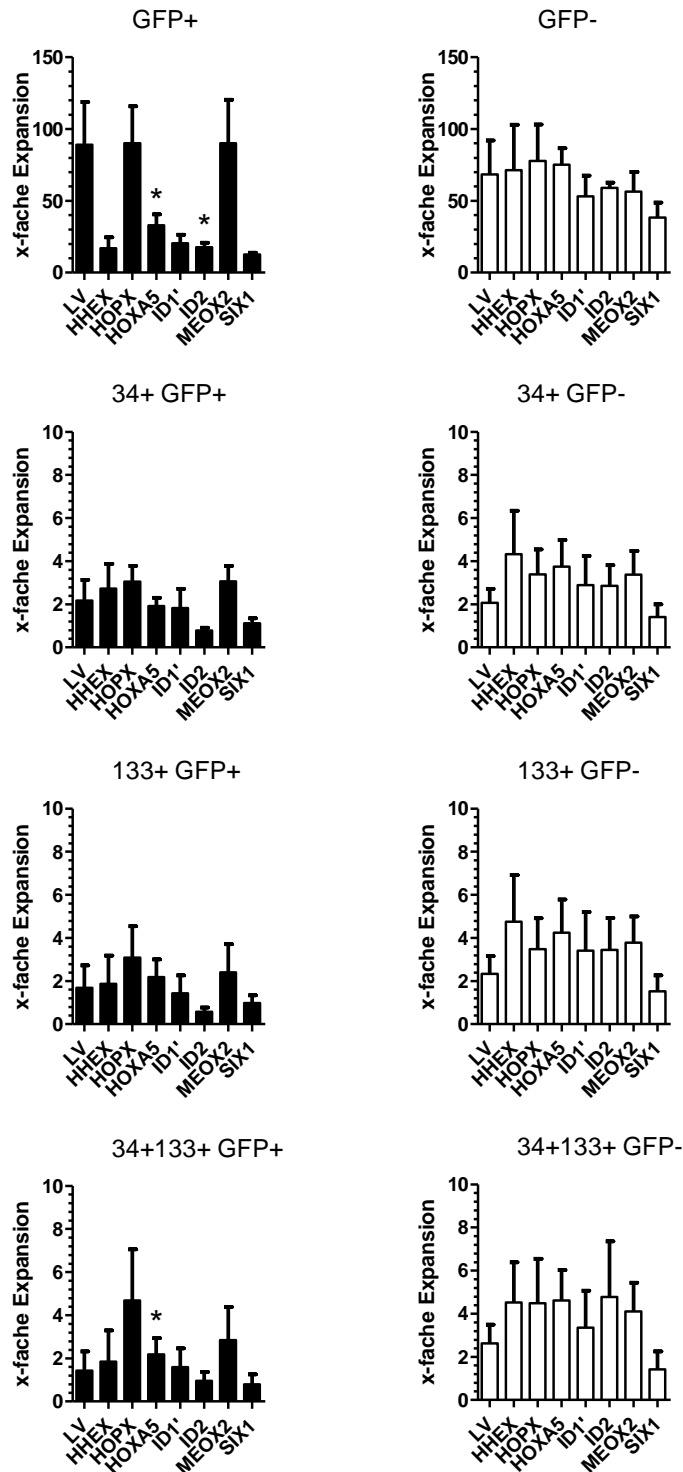


Abb. 3.14: Expansionsraten von Tag 3 zu Tag 14 der analysierten Populationen von manipulierten und nicht-manipulierten Zellen.

Aufgrund von interindividuellen Schwankungen der verwendeten Nabelschnurrestblute sind jeweils die Werte entsprechender Leervektor-Kontrollansätze (LV) zum Abgleich herangezogen worden. Angegeben ist jeweils der Mittelwert und SEM von 3 unabhängigen Versuchen. ° = Signifikanzberechnung im Vergleich zur internen Kontrolle, * = Signifikanzberechnung im Vergleich zur Leervektor Kontrolle (T-Test, zweiseitig, gepaart; $p \leq 0,05$).

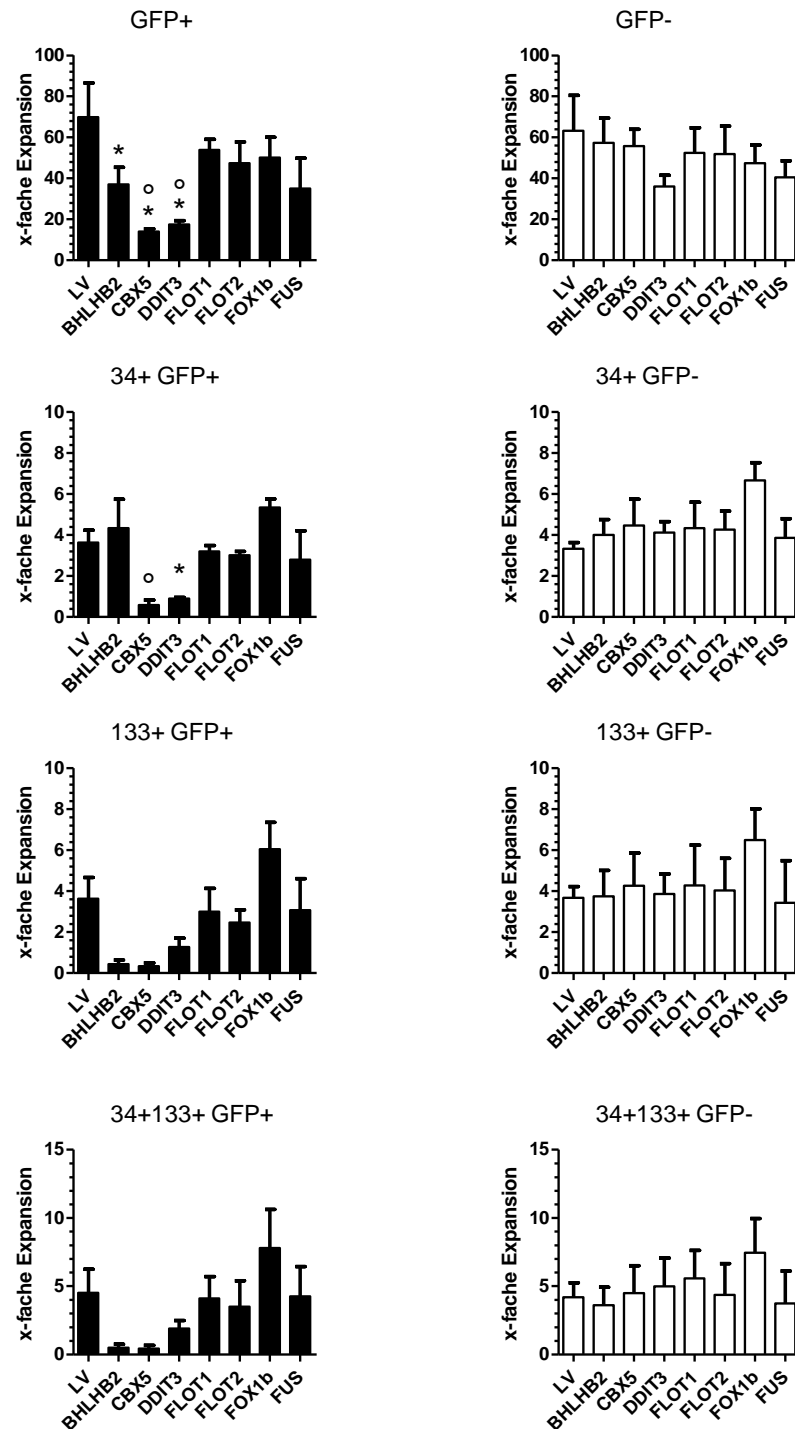


Abb. 3.15: Expansionsraten von Tag 3 zu Tag 14 der analysierten Populationen von manipulierten und nicht-manipulierten Zellen.

Aufgrund von interindividuellen Schwankungen der verwendeten Nabelschnurrestblute sind jeweils die Werte entsprechender Leervektor-Kontrollansätze (LV) zum Abgleich herangezogen worden. Angegeben ist jeweils der Mittelwert und SEM von 3 unabhängigen Versuchen. ° = Signifikanzberechnung im Vergleich zur internen Kontrolle, * = Signifikanzberechnung im Vergleich zur Leervektor Kontrolle (T-Test, zweiseitig, gepaart; $p \leq 0,05$).

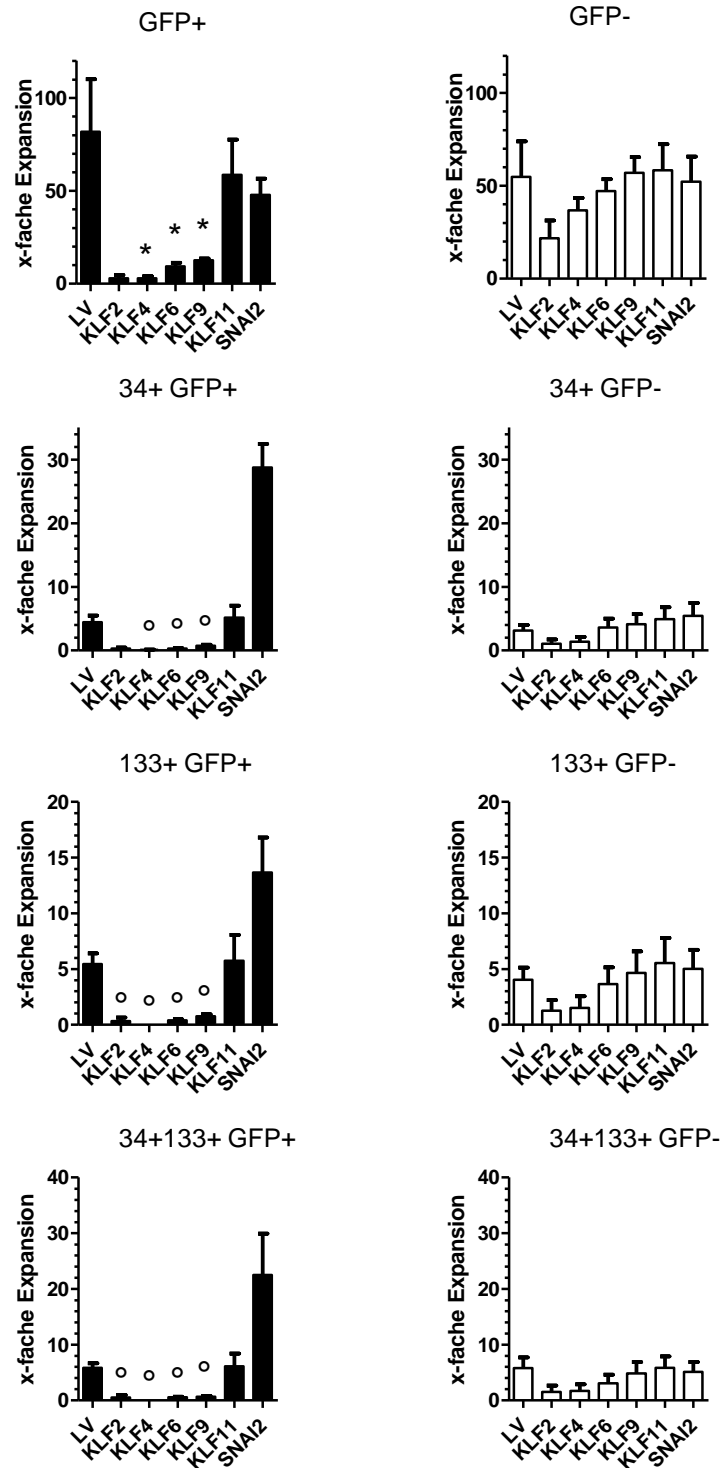


Abb. 3.16: Expansionsraten von Tag 3 zu Tag 14 der analysierten Populationen von manipulierten und nicht-manipulierten Zellen.

Aufgrund von interindividuellen Schwankungen der verwendeten Nabelschnurrestblute sind jeweils die Werte entsprechender Leervektor-Kontrollansätze (LV) zum Abgleich herangezogen worden. Angegeben ist jeweils der Mittelwert und SEM von 3 unabhängigen Versuchen. ° = Signifikanzberechnung im Vergleich zur internen Kontrolle, * = Signifikanzberechnung im Vergleich zur Leervektor Kontrolle (T-Test, zweiseitig, gepaart; $p \leq 0,05$).

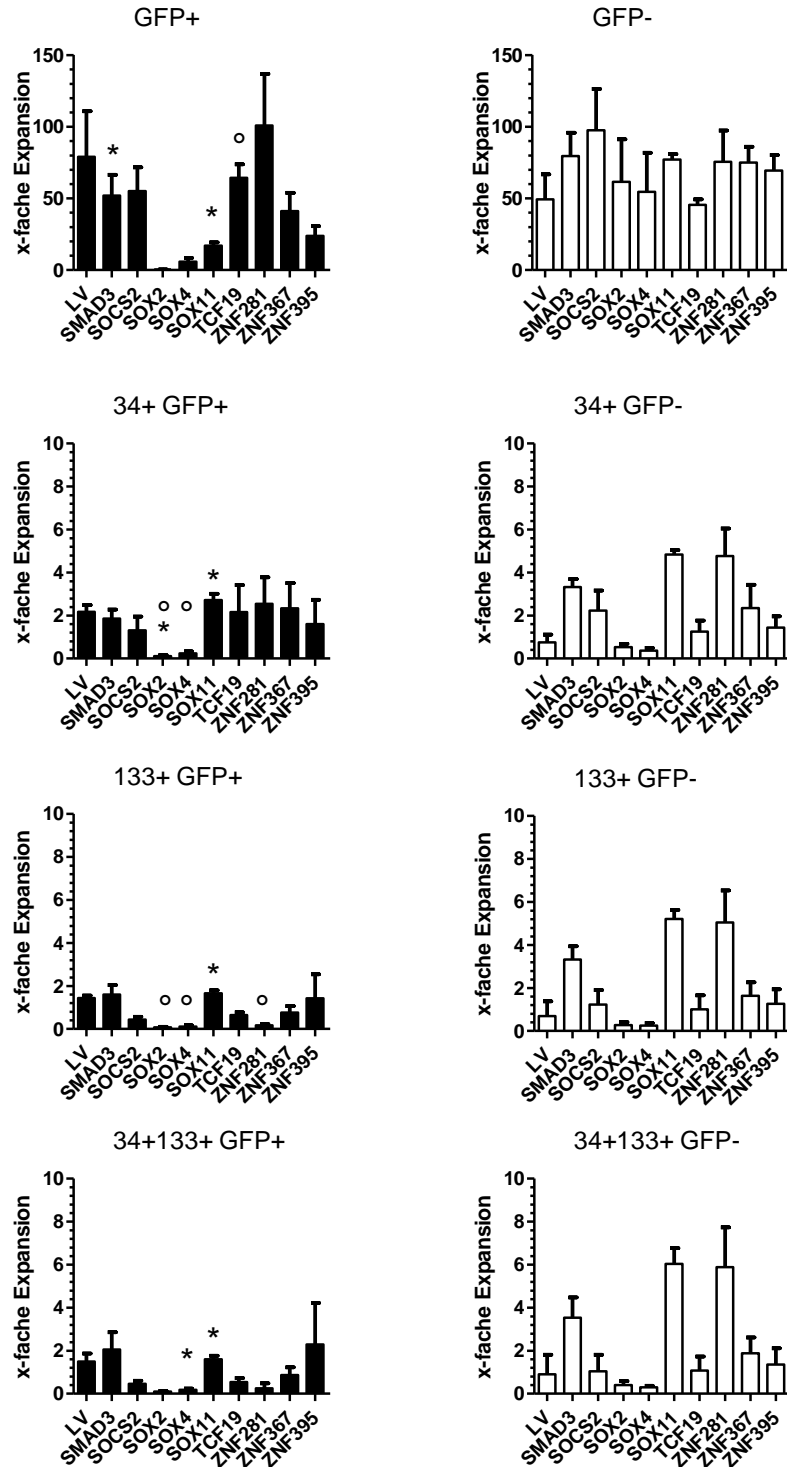


Abb. 3.17: Expansionsraten von Tag 3 zu Tag 14 der analysierten Populationen von manipulierten und nicht-manipulierten Zellen.

Aufgrund von interindividuellen Schwankungen der verwendeten Nabelschnurrestblute sind jeweils die Werte entsprechender Leervektor-Kontrollansätze (LV) zum Abgleich herangezogen worden. Angegeben ist jeweils der Mittelwert und SEM von 4 unabhängigen Versuchen. ° = Signifikanzberechnung im Vergleich zur internen Kontrolle, * = Signifikanzberechnung im Vergleich zur Leervektor Kontrolle (T-Test, zweiseitig, gepaart; $p \leq 0,05$).

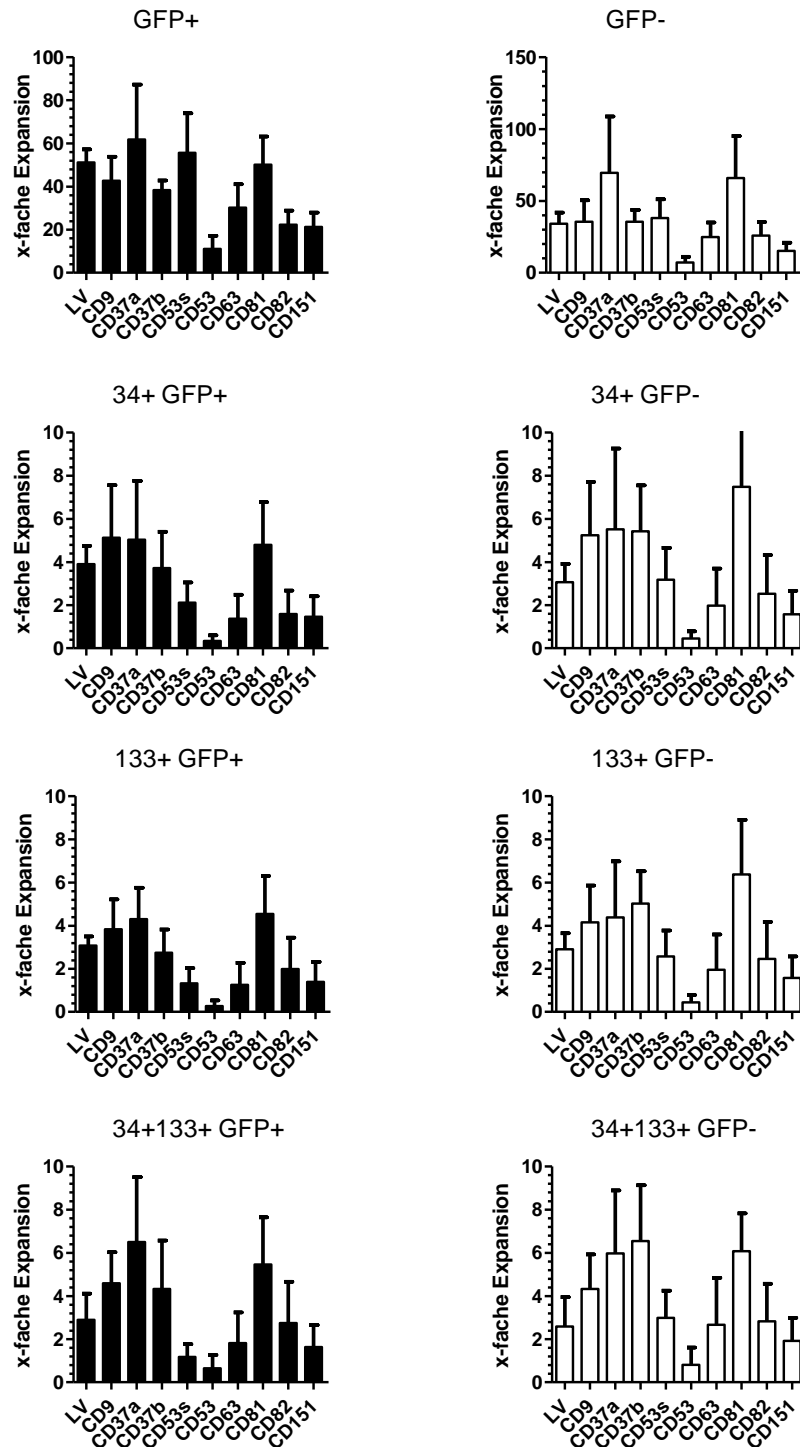


Abb. 3.18: Expansionsraten von Tag 3 zu Tag 14 der analysierten Populationen von manipulierten und nicht-manipulierten Zellen.

Aufgrund von interindividuellen Schwankungen der verwendeten Nabelschnurrestblute sind jeweils die Werte entsprechender Leervektor-Kontrollansätze (LV) zum Abgleich herangezogen worden. Angegeben ist jeweils der Mittelwert und SEM von 3 unabhängigen Versuchen. ° = Signifikanzberechnung im Vergleich zur internen Kontrolle, * = Signifikanzberechnung im Vergleich zur Leervektor Kontrolle (T-Test, zweiseitig, gepaart; $p \leq 0,05$).

Aufgrund der hohen Streuung der Werte durch interindividuelle Unterschiede der Nabelschnurblute, wurde nur bei einigen Vergleichen ein P-Wert unter 0,05 erreicht. Es kann somit bei einigen Unterschieden in der Expansion diverser Zellpopulationen nur von Tendenzen ausgegangen werden. *BHLHB2* und *ZNF281* unterdrückten die Proliferation von $CD133^+$ Zellen, die Anzahl an $CD34^+$ Zellen war verringert. *SOX9* hatte einen positiven Effekt auf die Expansion von $CD34^+$ Zellen, die Expansion von GFP^+ und $CD133^+$ Zellen war jedoch verringert. *SOX11* verlangsamte die Expansion der transduzierten (GFP^+) Zellen. $CD34^+$ und $CD133^+$ Zellen proliferierten moderat. Sowohl *CEBPD*, als auch *KLF4* transduzierte Zellen (GFP^+) proliferierten, die Anzahl von $CD34^+$ und $CD133^+$ Zellen verringerte sich in diesen Ansätzen über die Zeit. Die Anzahl an *SOX2* transduzierten Zellen verringerte sich am stärksten von allen Versuchen, und auch die Anzahl der Zellen in den Subpopulationen wurde in diesen Ansätzen kleiner. Im Ansatz mit *SOX11* transduzierten Zellen war die Expansion der $eGFP^+$ Population verringert, nicht aber die der $CD34^+$ und $CD133^+$ Zellen. *SNAI2* transduzierte Zellen expandierten ähnlich wie Zellen der LV-Kontrolle, jedoch nahm die Anzahl an $CD34^+$, als auch $CD133^+$ Zellen stark zu. Des Weiteren verursachten die Faktoren *HHEX*, *HOPX*, *ID3*, *KLF2*, *MLLT3* und *ZNF395* eine geringere Expansion der $CD133^+$ Zellen. In den Ansätzen *KLF2*, *KLF6* und *KLF9* war die Proliferation aller Zellpopulationen vermindert. *KLF11* transduzierte Zellen ließen kein Unterschied in der Expansion der Populationen erkennen. Die Expansion von *SOX4* transduzierten Zellen war, ähnlich wie bei *SOX2* transduzierten Zellen, in allen Populationen verringert. In den Ansätzen *CBX5* und *DDIT3* war die Expansion aller Zellentitäten verringert. In Abbildung 3.13 ist zu erkennen, dass die Zellen die Leervektor Kontrolle dieser Versuchsreihe eine auffallend geringe Expansionsrate bezüglich der $CD34^+$ und der $CD133^+$ Populationen hatte. Die $eGFP^+$ Population verhielt sich jedoch ähnlich wie die von Kontrollansätzen anderer Versuchsreihen. Dies könnte auf die interindividuellen Unterschiede der Nabelschnurblute zurückzuführen sein. Es ist aber auch möglich, dass die Färbung oder die durchflusszytometrischen Messungen Fehlerhaft waren. Weiterhin auffällig ist der Ansatz mit *CD53* transduzierten Zellen. Alle betrachteten Populationen verringern sich über die Zeit, und auch die betrachteten Populationen der nicht-manipulierten Zellen der *CD53* Ansätze nehmen über die Zeit ab. Hier liegt möglicherweise ein parakriner Effekt vor, der auf einen exosomalen Transfer des *CD53* Proteins beruht.

Ausgewählte Kandidatengene wurden mittels lentiviralen Gentransfer stabil in frisch isolierte CD34⁺ Zellen eingebracht. Die Zellen wurden 14 Tage kultiviert und an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach der Transduktion gefärbt sowie durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurden die Zellen der Ansätze bezüglich der Signale des Reporterproteins eGFP und der Marker CD34 sowie CD133 über die Zeit betrachtet, dokumentiert und ausgewertet. Es wurden Gene identifiziert die im zeitlichen Verlauf die Dynamik der CD34⁺ und CD133⁺ Populationen von transduzierten Zellen im Abgleich mit den Kontrollen veränderten. Dabei wiesen Zellen, die mit den Genen *BHLHB2*, *CEBPD*, *KLF4*, *SNAI2*, *SOX2*, *SOX9*, *SOX11* und *ZNF281* transduziert waren, die auffälligsten Abweichungen in der Dynamik der beobachteten Subpopulationen auf. Diese Abweichungen in der Dynamik der Subpopulationen wurden, im Abgleich mit den Kontrollen, verschiedenen Gruppen zugeteilt. Alle weiteren untersuchten Gene verursachten im Vergleich zu den Kontrollwerten nur leichte bzw. gar keine Veränderungen bezüglich der Dynamik der Subpopulationen und wurden der Gruppe D zugeordnet. Im Besonderen soll hier erwähnt sein, dass Zellen die mit Tetraspaninen transduziert waren, keine veränderte Dynamik bezüglich der CD34⁺ und CD133⁺ Populationen aufwiesen. Sie wurden somit der Gruppe D zugeordnet.

3.4 Tetraspanine als molekulare Werkzeuge

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, führte die Expression der verschiedenen Tetraspanine zu keinem erkennbaren Effekt auf die Entscheidung Selbsterneuerung *versus* Differenzierung von HSVZ. Die Tetraspanine CD63 und CD53 werden bei etwas 20-30% der initialen Zellteilungen von CD34⁺ Zellen asymmetrisch verteilt (Beckmann et al. 2007) und sind mit dem endosomalen System assoziiert (Escola et al. 1998; Kobayashi et al. 2000). Es wurde bereits beschrieben, dass ein Bezug zwischen Endozytose und dem Entwicklungsschicksal von Zellen in den Modellorganismen *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* existiert (Bokel et al. 2006; Andrews und Ahringer 2007). Aufgrund der Tatsache, dass die Tetraspanine CD53 und CD63 bei initialen Zellteilungen von HSVZ asymmetrisch verteilt werden, haben wir nach Möglichkeiten gesucht, solche asymmetrischen Zellteilungen bei lebenden Zellen verfolgen zu können.

Ein mögliches Werkzeug zur Analyse bzw. Nachverfolgung asymmetrischer Zellteilungen in HSVZ stellen Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine dar. Hierbei wird mittels molekularbiologischer Methoden ein Vektor mit einer Expressionskassette

erstellt, die für das Protein von Interesse (hier Tetraspanine) kodiert, an dem ein Fluoreszenzprotein (z.B. eGFP) als Reporter fusioniert ist. Es wurden Expressionskassetten konzipiert, die für Tetraspanin-eGFP sowie Tetraspanin-mCherry Reporterkonstrukte kodieren. Da sich sowohl C- als auch N-Terminal von Tetraspaninen Palmitylierungsstellen befinden (Stipp et al. 2003; Levy und Shoham 2005), konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der Reporterproteinanteil von Fusionsproteinen die natürliche Verteilung der Tetraspanine beeinflusst (siehe Diskussion). Aus diesem Grund sollten sowohl C- als auch N-terminale Fusionskonstrukte wie folgt geplant und hergestellt werden:

eGFP C-Terminal	eGFP N-Terminal	mCherry C-Terminal
CD9-eGFP	eGFP-CD9	CD9-mCherry
CD37a-eGFP	eGFP-CD37a	CD37a-mCherry
CD37b-eGFP	eGFP-CD37b	CD37b-mCherry
CD53s-eGFP	eGFP-CD53s	CD53s-mCherry
CD53-eGFP	eGFP-CD53	CD53-mCherry
CD63-eGFP	eGFP-CD63	CD63-mCherry
CD81-eGFP	eGFP-CD81	CD81-mCherry
CD82-eGFP	eGFP-CD82	CD82-mCherry
CD151-eGFP	eGFP-CD151	CD151-mCherry

Mit Hilfe der Fusionsproteine sollte in dieser Arbeit analysiert werden, ob Tetraspanin-Fusionskonstrukte nach Transduktion und aberranter Expression in eukaryotischen Zellen einen Einfluss auf das endosomale System ausüben. Kann ein Einfluss auf das endosomale System ausgeschlossen werden, so eignen sich die Tetraspanin-Fusionsproteine möglicherweise als molekularbiologisches Werkzeug zur mikroskopischen Nachverfolgung asymmetrischer Zellteilungen in HSVZ. Weiterhin sollten Lokalisationsmuster von stabil exprimierten Tetraspanin-Fusionsproteinen mikroskopisch analysiert werden.

3.5 Generierung lentiviraler Vektoren

Um die Tetraspanin-Fusionskonstrukte in Zellen stabil zu exprimieren, wurde die Methode des lentiviralen Gentransfers gewählt. Um Lentiviren herzustellen, mussten lentivirale Vektoren, die die Tetraspanine kodieren, generiert werden. Hierfür wurden cDNA-Banken aus der RNA verschiedener Zellen generiert. Diese cDNA-Banken dienten als Matrize zur PCR basierten Amplifikation der Tetraspanine. Die PCR-Produkte wurden in transiente Plasmide überführt, welche in Folge für eine

Expressionskassette aus Tetraspanin und eGFP als Reporterprotein kodieren. Diese Expressionskassette wurde aus den transienten Plasmiden in lentivirale Vektoren überführt. Mit Hilfe dieser Vektoren können virushaltige Medienüberstände, wie unter 2.2.5 beschrieben, hergestellt werden. Diese Überstände bzw. Anteile davon werden zu FaDu-, N-KM- und THP1-Zellen appliziert, was eine stabile Transduktion der Zellen mit den Fusionskonstrukten ermöglicht (siehe Kapitel 2.2.5 und 2.2.7).

3.5.1 Generierung von cDNA Banken

Expressionsprofile von humanen umbilikalen Venenendothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells, HUVEC*) und endothelialen koloniebildenden Zellen (*endothelial colony forming cells, ECFC*) zeigten auf, dass Tetraspanine in diesen Zellen exprimiert werden. Damit eigneten sich cDNA-Banken dieser Zellen für eine PCR basierte Amplifikation von Tetraspaninen. Es wurden cDNA-Banken aus diesen Zellen hergestellt, deren Qualitäten für hiesige Zwecke nicht analysiert wurde. Die Zellen lagen in der Arbeitsgruppe vor (Denecke et al. 2013). Die generierten cDNA-Banken dienten als Matrize zur Amplifikation von Tetraspaninen mittels spezifischer Oligonukleotide. Plasmide die für die Tetraspanine CD53, CD53s und CD63 kodieren, lagen in der Arbeitsgruppe bereits vor und dienten als Matrize zur Amplifikation.

3.5.2 Konzeption der Fusionsproteine

Für die PCR-basierte Amplifikation der Tetraspanine wurden auch hier spezifische Oligonukleotide (Primer) konzipiert und deren Synthese bei einer Firma in Auftrag gegeben. Das Konzept der Primergestaltung war nahezu identisch mit dem der unter 3.2 beschriebenen Oligonukleotid-Strategie. Lediglich das Stop-Kodon der 3'-Primer wurde durch ein Kodon ersetzt, welches die durchgehende Translation eines Fusionsproteins mit Reporteranteil ermöglicht. Die 5'-Primer blieben unverändert. Die offenen Leseraster von CD9, CD37a, CD37b, CD53, CD63, CD81, CD82 und CD151 wurden nach der Amplifikation Restriktionsverdauen unterzogen und in entsprechend geöffnete peGFP-N1 und peGFP-C1 bzw. -C3 Vektoren überführt (Tab. 3.8). Im weiteren Verlauf wurden mittels weiterer Restriktionsverdau kodierende Expressionskassetten isoliert und in lentivirale Plasmide überführt (Tab. 3.9). Für die Tetraspanin-mCherry kodierenden Expressionskassetten wurden die offenen Leseraster der Tetraspanine aus den pCL6-Vektoren isoliert und in mCherry kodierende pCL7.2 Vektoren überführt.

Sämtliche lentiviralen Plasmide wurden nach Fertigstellung zur Überprüfung sequenziert.

Tab. 3.8: Verwendete Restriktionsendonukleasen in 5'- und 3'-Oligonukleotiden.

Gen	5' Schnittstelle	3' Schnittstelle	Produkt bp	Herkunft	Zielvektor
CD9	XhoI	EcoRI	705	ECFC cDNA	peGFP-N1
CD37a	Sall	EcoRI	870	HUVEC cDNA	peGFP-N1
CD37b	Sall	EcoRI	660	HUVEC cDNA	peGFP-N1
CD53	EcoRI	BamHI	688	pIRES-eGFP	peGFP-N1
CD53s	EcoRI	BamHI	589	pIRES-eGFP	peGFP-N1
CD63	XhoI	EcoRI	731	pIRES-eGFP	peGFP-N1
CD81	XhoI	EcoRI	729	ECFC cDNA	peGFP-N1
CD82	XhoI	EcoRI	755	ECFC cDNA	peGFP-N1
CD151	XhoI	EcoRI	780	ECFC cDNA	peGFP-N1
CD9	XhoI	EcoRI	705	ECFC cDNA	peGFP-C3
CD37a	Sall	EcoRI	870	HUVEC cDNA	peGFP-C3
CD37b	Sall	EcoRI	660	HUVEC cDNA	peGFP-C3
CD53	XhoI	EcoRI	688	pIRES-eGFP	peGFP-C1
CD53s	XhoI	EcoRI	589	pIRES-eGFP	peGFP-C1
CD63	XhoI	EcoRI	731	pIRES-eGFP	peGFP-C1
CD81	XhoI	EcoRI	729	ECFC cDNA	peGFP-C3
CD82	XhoI	EcoRI	755	ECFC cDNA	peGFP-C3
CD151	XhoI	EcoRI	780	ECFC cDNA	peGFP-C3

Tab. 3.9: Überführung der Fragmente in lentivirale Vektoren.

Gen	5' Schnittstelle	3' Schnittstelle	Fragment bp	Quellvektor	Zielvektor
CD9	NheI	BsrGI	1422	peGFP-N1	pCL6
CD37a	NheI	BsrGI	1587	peGFP-N1	pCL6
CD37b	NheI	BsrGI	1377	peGFP-N1	pCL6
CD53	NheI	BsrGI	1405	peGFP-N1	pCL6
CD53s	NheI	BsrGI	1306	peGFP-N1	pCL6
CD63	NheI	BsrGI	1448	peGFP-N1	pCL6
CD81	NheI	BsrGI	1446	peGFP-N1	pCL6
CD82	NheI	BsrGI	1472	peGFP-N1	pCL6
CD151	NheI	BsrGI	1497	peGFP-N1	pCL6
CD9	AgeI	EcoRI	1422	peGFP-C3	pCL7
CD37a	AgeI	EcoRI	1587	peGFP-C3	pCL7
CD37b	AgeI	EcoRI	1377	peGFP-C3	pCL7
CD53	AgeI	EcoRI	1405	peGFP-C1	pCL7
CD53s	AgeI	EcoRI	1306	peGFP-C1	pCL7
CD63	AgeI	EcoRI	1448	peGFP-C1	pCL7
CD81	AgeI	EcoRI	1446	peGFP-C3	pCL7
CD82	AgeI	EcoRI	1472	peGFP-C3	pCL7
CD151	AgeI	EcoRI	1497	peGFP-C3	pCL7
CD9	XhoI	EcoRI	705	pCL6	pCL7.2
CD37a	Sall	EcoRI	870	pCL6	pCL7.2
CD37b	Sall	EcoRI	660	pCL6	pCL7.2
CD53	XhoI	AgeI	688	pCL6	pCL7.2
CD53s	XhoI	AgeI	589	pCL6	pCL7.2
CD63	XhoI	EcoRI	731	pCL6	pCL7.2
CD81	XhoI	EcoRI	729	pCL6	pCL7.2
CD82	XhoI	EcoRI	755	pCL6	pCL7.2
CD151	XhoI	EcoRI	780	pCL6	pCL7.2

Die Leseraster der Expressionskassetten entsprachen alle den Erwartungen. Die validierten Vektoren wurden zur Herstellung lentiviraler Überstände verwendet. Die Plasmidkarten der verwendeten Vektoren befinden sich im Anhang.

3.6 Subzelluläre Lokalisation von Tetraspanin-Fusionsproteinen mit Bezug zum endosomalen System

Subzelluläre Musterbildungen lassen sich mittels inverser Mikroskopie detaillierter an adhärennten Zellen analysieren, weil diese sich großflächig am Boden des Zellkulturgefäßes befinden und damit eine bessere optische Auftrennung von Fluoreszenzsignalen ermöglichen als Suspensionszellen. HSVZ sind Suspensionszellen und fangen mit fortschreitender Kulturdauer an zu differenzieren. Zudem ist die Anreicherung von HSVZ zeit- und kostenintensiv. Aus diesen Gründen wurden zur

Analyse subzellulärer Verteilungsmuster von Tetraspanin-Fusionsproteinen Zelllinien gewählt, die adhärent sind bzw. durch PMA Stimulation adhärent werden können (THP1). Um wiederkehrende Musterkomponenten in verschiedenen Zellsystemen nachzuweisen, wurden Zellen mit unterschiedlicher Herkunft gewählt. FaDu-Zellen sind humane epitheliale Zellen, die aus einem Plattenepithelkarzinom isoliert worden sind (Rangan 1972). N-KM-Zellen sind mesenchymale Stammzellen (MSC). Sie wurden aus dem Knochenmark gesunder Personen isoliert und anschließend immortalisiert. Die N-KM Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Bertram Opalka (Klinik für Hämatologie, Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt. THP1-Zellen stammen aus dem Blut eines an akuter monozytärer Leukämie erkrankten Patienten (Tsuchiya et al. 1980; Abrink et al. 1994). Durch Behandlung mit Phorbolestern differenzieren THP1-Zellen zu Makrophagen-ähnlichen Zellen und werden adhärent (Tsuchiya et al. 1982).

Für die Analysen wurden FaDu-, N-KM- und THP1-Zellen zunächst durchflusszytometrisch bezüglich ihrer endogenen Tetraspaninexpression charakterisiert. Nun wurden Zellen dieser Zelllinien stabil mit Tetraspanin-Fusionskonstrukten transduziert, durchflusszytometrisch sortiert und kultiviert. Um zu überprüfen, ob die Fusionsproteine in transduzierten Zellen ordnungsgemäß translatiert werden und persistent sind, wurde ihre Reaktivität mit entsprechenden Antikörpern durchflusszytometrisch getestet. Die Integrität der Fusionsproteine wurde weiterhin in Western Blot Analysen überprüft. Um zu analysieren ob die Tetraspanin-Fusionsproteine das endosomale System beeinflussen, wurden Zellen, die stabil Tetraspanin-Fusionsproteine exprimieren, mit Markern des frühen (EEA1, Rab5) und späten (CD63, Rab7) endosomalen Kompartiments immunzytochemisch angefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Bei initialen mikroskopischen Analysen von Zellen die mit CD82- und CD151-eGFP transduziert waren, konnten Vesikelstrukturen prominent in Zellausläufern beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Morphologie von transduzierten Zellen verändert war. Um putative Effekte der Fusionsproteine auf das Zytoskelett erkennen zu können, wurden an Tetraspanin-eGFP transduzierten FaDu-, N-KM- und THP1-Zellen Färbungen gegen Aktin sowie Tubulin durchgeführt und mikroskopisch ausgewertet. Auch die Plasmamembran sollte möglichst detailreich dargestellt werden, um zu untersuchen ob die Überexpression der Fusionskonstrukte eine Veränderung in der Morphologie der Zellmembran bewirken. In extrazellulären immunzytochemischen Färbeversuchen stellte sich heraus, dass CD81

zur optischen Darstellung der Zellmembran am besten geeignet ist. Mit Hilfe von Färbungen gegen CD81 wurde die Plasmamembran von Tetraspanin-eGFP transduzierten FaDu-, N-KM- und THP1-Zellen mikroskopisch analysiert.

3.6.1 Endogene Tetraspaninexpression von verschiedenen Zelllinien

Die ausgewählten Zelllinien wurden zunächst hinsichtlich ihrer endogenen Expression der zu untersuchenden Tetraspanine charakterisiert. Hierfür wurden Zellen der Zelllinien FaDu, N-KM und THP1 mit FITC- bzw. PE-konjugierten Antikörpern gegen die verschiedenen Tetraspanine untersucht. Dabei wurden die Tetraspanine CD9, CD37, CD53 und CD63 mit FITC-konjugierten Antikörpern, und die Tetraspanine CD37, CD81, CD82 und CD151 mit PE-konjugierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Die durchflusszytometrischen Analysen von nicht-manipulierten FaDu-Zellen zeigten, dass die Tetraspanine CD9, CD81, CD82 und CD151 auf der Zelloberfläche von FaDu-Zellen vorhanden waren. CD37, CD53 und CD63 waren mit den verwendeten Antikörpern auf der Zelloberfläche nicht nachweisbar (Abb. 3.19).

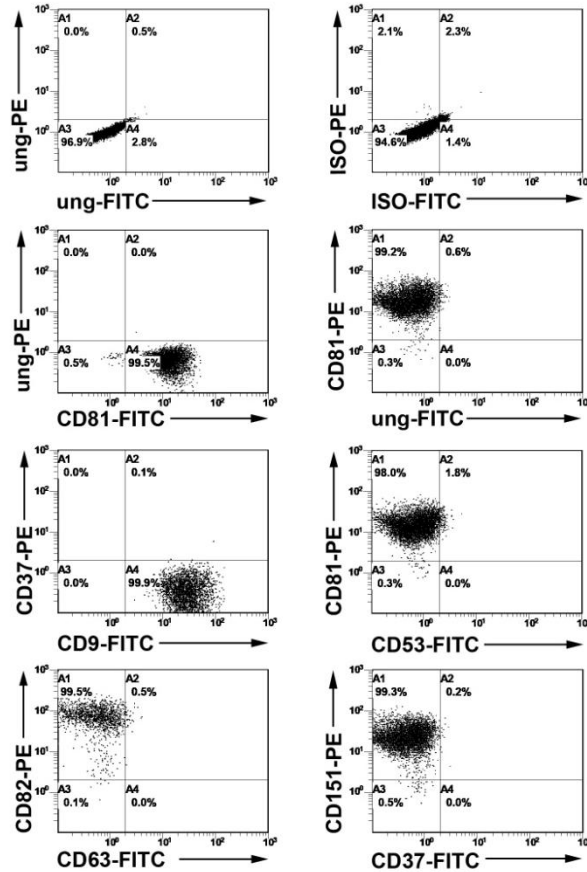


Abb. 3.19: Tetraspaninexpression auf nicht-manipulierten FaDu-Zellen.

Durchflusszytometrische Analysen von FaDu-Zellen. Die Zellen wurden mit Isotyp-AK sowie AK gegen CD9, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82 und CD151 gefärbt. Mit Färbungen gegen CD81 wurden FITC- und PE-Signale kompensiert.

Die Tetraspannine CD9, CD81 und CD151 sind auf N-KM-Zellen nachweisbar. CD63 und CD82 wurden schwach detektiert. CD37 und CD53 konnten mit den verwendeten Antikörpern nicht auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Abb. 3.20).

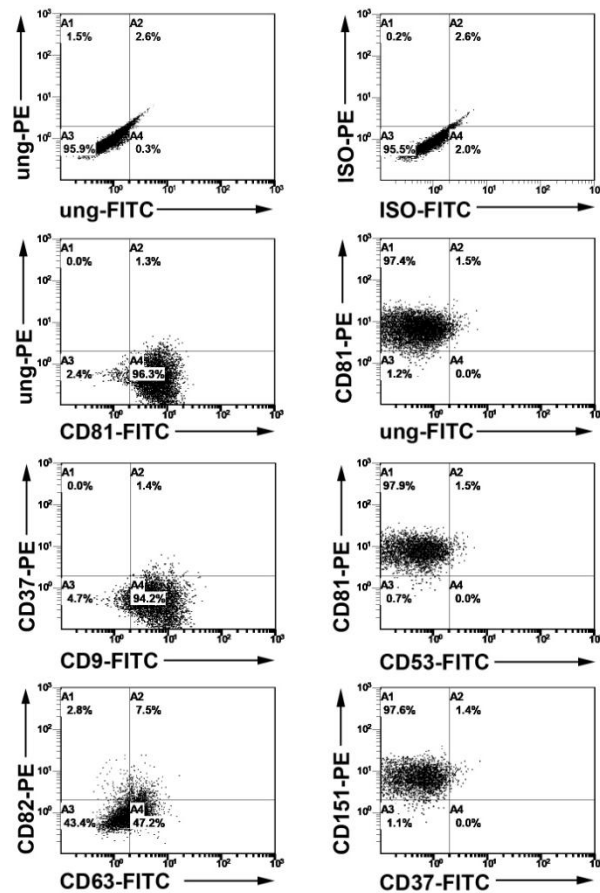


Abb. 3.20: Tetraspaninexpression auf nicht-manipulierten N-KM-Zellen.

Durchflusszytometrische Analysen von N-KM-Zellen. Die Zellen wurden mit Isotyp-AK sowie AK gegen CD9, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82 und CD151 gefärbt. Mit Färbungen gegen CD81 wurden FITC- und PE-Signale kompensiert.

Auf THP1-Zellen konnten die Tetraspannine CD9, CD37, CD53, CD81, CD82 und CD151 nachgewiesen werden (Abb. 3.21). Auch auf PMA stimulierten THP1-Zellen waren die Tetraspannine CD9, CD37, CD53, CD81, CD82 und CD151 nachweisbar. Ihre Expression war im Allgemeinen stärker als auf nicht PMA stimulierten THP1-Zellen. Die Frequenz an CD82 und CD37 positiven Zellen verringerte sich (Abb. 3.22).

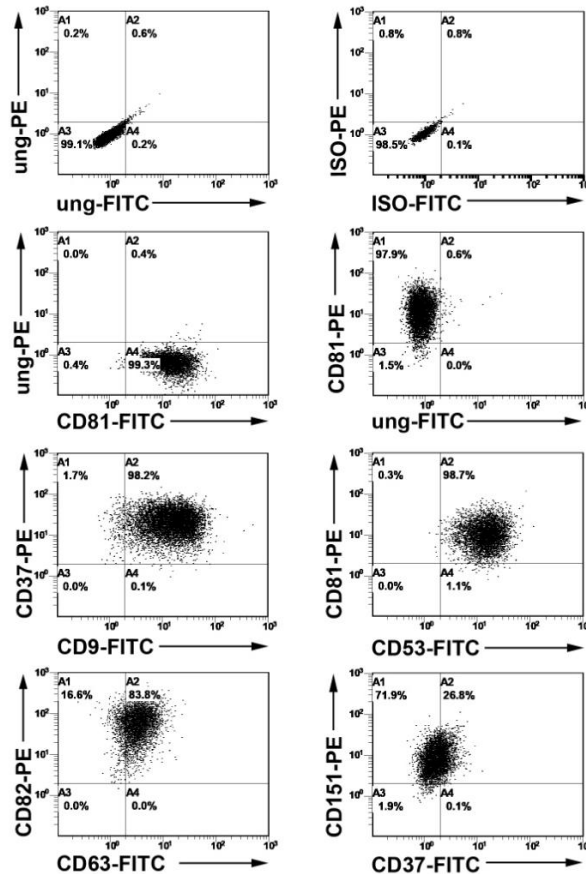


Abb. 3.21: Tetraspaninexpression auf nicht-manipulierten THP-1-Zellen (Monozyten).

Durchflusszytometrische Analysen von THP1-Zellen. Die Zellen wurden mit Isotyp-AK sowie AK gegen CD9, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82 und CD151 gefärbt. Mit Färbungen gegen CD81 wurden FITC- und PE-Signale kompensiert.

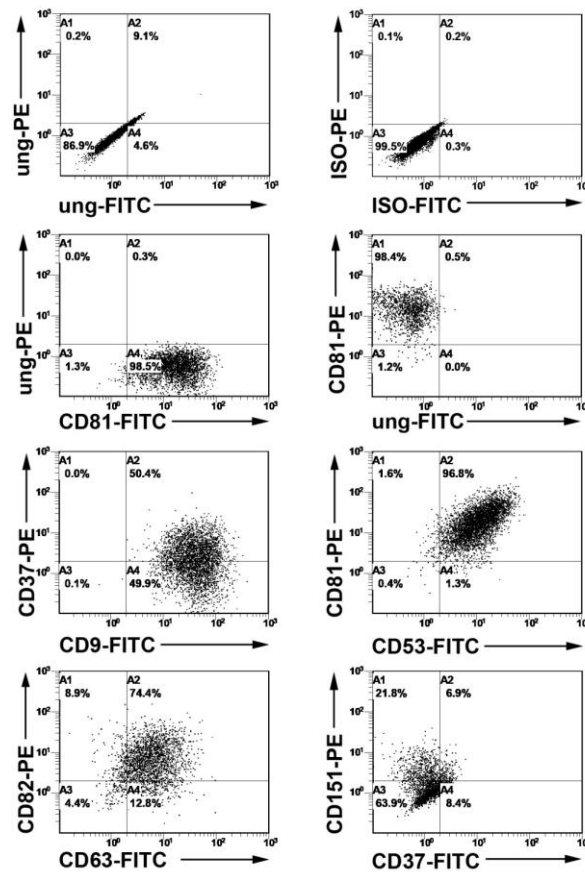


Abb. 3.22: Tetraspaninexpression auf nicht-manipulierten THP-1-Zellen (Makrophagen).

Durchflusszytometrische Analysen von PMA stimulierten THP1-Zellen. Die Zellen wurden mit Isotyp-AK sowie AK gegen CD9, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82 und CD151 gefärbt. Mit Färbungen gegen CD81 wurden FITC- und PE-Signale kompensiert.

Die Tetraspanine CD9, CD81 und CD151 waren auf allen Zellen nachweisbar. CD63 wurde auf N-KM- und THP1-Zellen detektiert. CD82 wurde auf FaDu- und THP1-Zellen nachgewiesen. CD37 und CD53 waren exklusiv auf den THP1-Zellen und PMA stimulierten THP1-Zellen vorhanden. Auf der Oberfläche von THP1-Zellen wurden alle Tetraspanine nachgewiesen.

3.6.2 Stabile Transduktion und Sortierung von Zellen

Um die subzelluläre Lokalisation der Tetraspanin-eGFP-Fusionsproteine *per se* und im Bezug zum endosomalen System zu untersuchen, wurden FaDu-, N-KM- und THP1-Zellen mit Tetraspanin-eGFP Fusionskonstrukten transduziert und weiter kultiviert. Die subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine mit Bezug zum endosomalen System sollte in späteren Experimenten mikroskopisch untersucht werden. Hierfür ist es von

Vorteil einen hohen Anteil an transduzierten Zellen zu haben, um möglichst alle auftretenden Effekte beobachten und von Zelle zu Zelle beurteilen und vergleichen zu können. Im weiteren Verlauf wurde der Gehalt an eGFP⁺ Zellen der einzelnen Ansätze durchflusszytometrisch überprüft. In den Ansätzen befanden sich teilweise hohe Anteile nicht-transduzierter Zellen (Tab. 3.10). Aus diesem Grund wurden die eGFP⁺ Populationen transduzierter FaDu-, N-KM- und THP1-Zellen mittels durchflusszytometrischen Zellsortierungen angereichert (Abb. 3.23; Tab. 1.10).

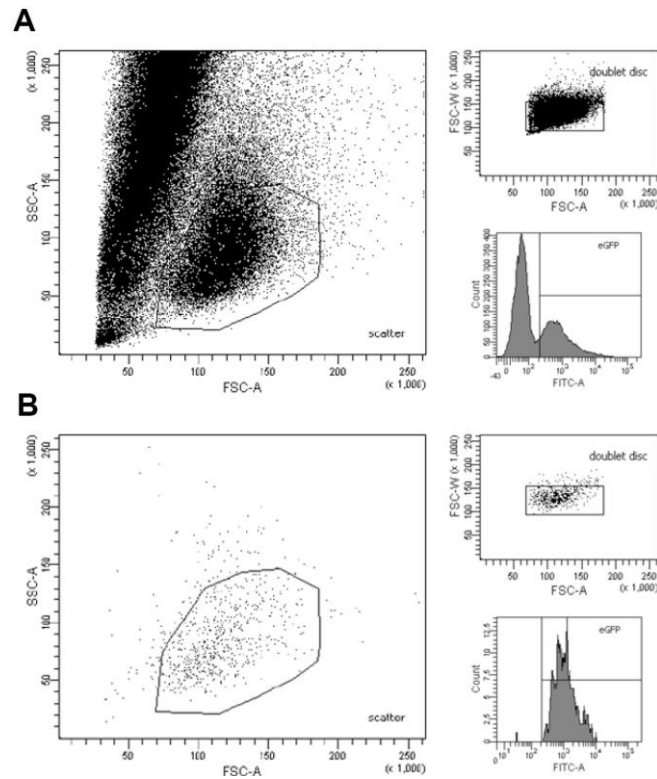


Abb. 3.23: Zellsortierung am Beispiel von CD37a-eGFP transduzierten THP-1 Zellen.

A: Zunächst wurde eine Region definiert, in der sich erfahrungsgemäß die lebenden Zellen befinden. Zellaggregate wurden von den Sortierungen ausgeschlossen. Zellen die sich innerhalb der Region eGFP⁺ befanden, wurden sortiert. B: Re-Analyse sortierter Zellen unmittelbar nach der Zellsortierung.

Tab. 3.10: Anteil an eGFP⁺ Zellen vor und nach der durchflusszytometrischen Sortierung.

Fusionskonstrukt	N-KM % eGFP positiv		FaDu % eGFP positiv		THP1 % eGFP positiv	
	vor Sortierung	nach Sortierung	vor Sortierung	nach Sortierung	vor Sortierung	nach Sortierung
CD9-eGFP	8,4	81,8	9,3	74,5	50,7	97,9
CD37a-eGFP	1,0	78,7	3,4	62,6	36,5	96,3
CD37b-eGFP	7,8	78,7	25,1	58,5	70,6	99,3
CD53s-eGFP	14,9	93,4	29,0	66,0	61,9	99,3
CD53-eGFP	16,5	89,7	23,0	76,0	92,8	99,6
CD63-eGFP	7,7	81,1	9,7	69,6	57,6	99,1
CD81-eGFP	2,6	92,8	4,9	67,5	88,6	99,2
CD82-eGFP	8,1	84,4	5,7	62,5	43,5	98,2
CD151-eGFP	11,0	89,3	15,4	70,5	72,3	99,8

Transduzierte FaDu-Zellen wurden zu einer durchschnittlichen Reinheit von $85,5\% \pm 5,8\%$ angereichert. Transduzierte N-KM-Zellen wurden zu einer durchschnittlichen Reinheit von $67,5\% \pm 5,8\%$ angereichert. Transduzierte THP1-Zellen wurden zu einer durchschnittlichen Reinheit von $98,7\% \pm 1,1\%$ angereichert (Tab. 1.10). Aus zeittechnischen Gründen wurden lediglich Zellen sortiert und analysiert, die mit Fusionskonstrukten transduziert waren, die ein eGFP-Reporterprotein am C-Terminus des Tetraspanins aufwiesen. Die Zellen wurden weiter kultiviert und für nachfolgende Analysen verwendet. Der Anteil an eGFP⁺ Zellen der Ansätze konnte durch die durchflusszytometrische Sortierung deutlich erhöht werden.

3.6.3 Durchflusszytometrische Analysen stabil transduzierter Zellen

Im weiteren Verlauf wurde getestet, ob die Fusionsproteine an der Zelloberfläche der transduzierten Zellen exprimiert werden. Hierfür wurden transduzierte und sortierte FaDu-, N-KM- und THP1-Zellen durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3.24 bis 3.26).

Tetraspanin-eGFP exprimierende Zellen wurden extrazellulär mit den jeweils entsprechenden PE-konjugierten Antikörpern gefärbt, z.B. wurden CD9-eGFP transduzierte Zellen mit CD9-PE Antikörpern gefärbt. Die Analyse erfolgte durch die Darstellung der eGFP-Signale gegen PE-Signale. Je stärker das eGFP-Signal ist, desto mehr Fusionsprotein ist vorhanden. Vorausgesetzt, die Fusionsproteine werden in die Zellmembran eingebaut und die Antikörper reagieren mit dem jeweiligen Tetraspanin der Fusionsproteine, so sollten transduzierte und entsprechend gefärbte Zellen mit steigender eGFP-Intensität eine steigende PE-Intensität aufweisen. Durch den Abgleich mit der endogenen Expression der Tetraspanine in den verschiedenen Zelllinien kann man analysieren, ob die entsprechenden AK an das endogen exprimierte Tetraspanin oder das Tetraspanin-Fusionsprotein gebunden haben.

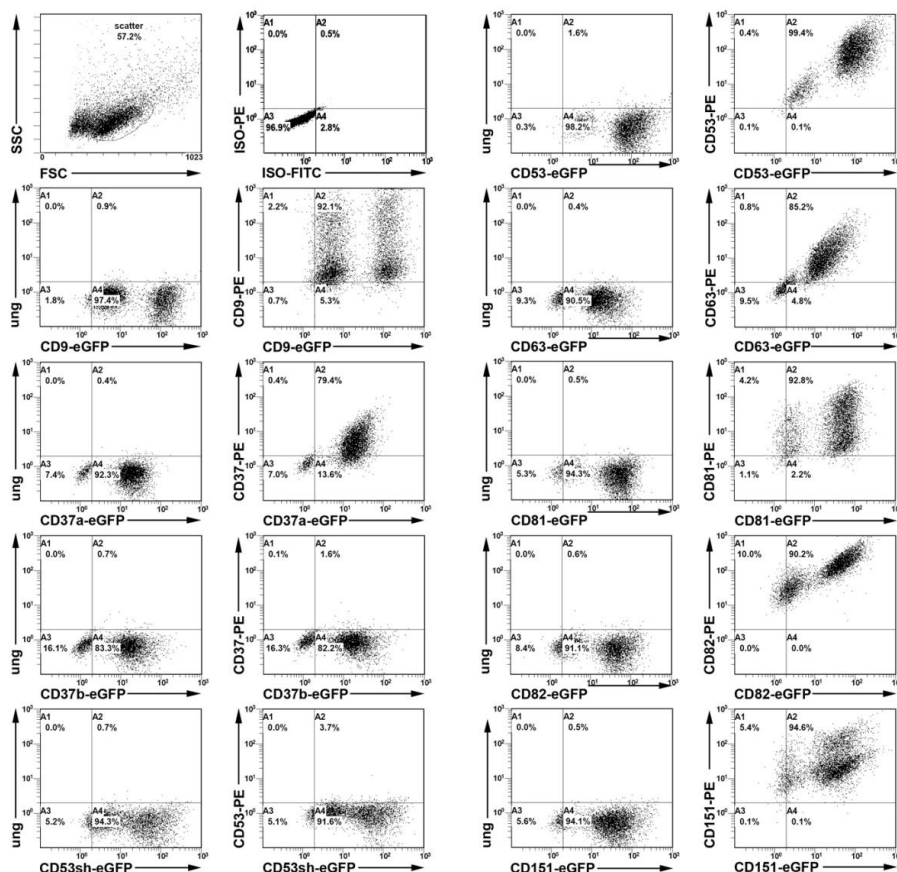


Abb. 3.24: Durchflusszytometrische Analysen von FaDu-Zellen, die stabil mit verschiedenen Tetraspanin-eGFP Fusionsproteinen transduziert wurden.

Es sind die Messungen an Tetraspanin-eGFP transduzierten Zellen jeweils vor und nach AK-Färbung dargestellt. Es wurden Isotyp-AK und entsprechende AK gegen die jeweils transduzierten Tetraspanin-Fusionsproteine für die extrazelluläre Färbung der Zellen verwendet.

FaDu-Zellen, die mit CD9-, CD81- und CD151-eGFP transduziert waren, wiesen nach der AK-Färbung mehrere Populationen auf. Dies ist ein Effekt, der möglicherweise durch die Internalisierung der Tetraspanine-Fusionsproteine verursacht wird (siehe Diskussion). Die gefärbten CD37a-, CD53-, CD63- und CD82-eGFP transduzierten Zellen hatten mit steigender eGFP-Intensität eine steigende PE-Intensität. CD53s-eGFP und CD37b-eGFP transduzierte Zellen wiesen nach der Färbung kein PE-Signal auf (Abb. 3.24). Die immunogenen Epitope der Tetraspanine liegen in der Regel in der zweiten extrazellulären Schleife vor (Stipp et al. 2003). Der Isoform CD53s fehlen 32 Aminosäuren in der zweiten extrazellulären Schleife (siehe 3.3.2; S.61). Es lässt sich vermuten, dass CD53s das immunogene Epitop nicht ausbildet und in Folge dessen nicht von den verwendeten Antikörpern detektiert wurde. Auch verschiedene andere Klone monoklonaler Antikörper gegen CD53 sowie polyklonale Antikörper, haben nicht an diese Isoform gebunden. CD37b fehlt die erste extrazelluläre Schleife (siehe

3.3.2; S.61). Betrachtet man die CD37b-eGFP transduzierten Zellen mikroskopisch unter Fluoreszenz anregendem UV-Licht (Abb. 3.33), fällt auf, dass das eGFP-Signal diffus in der ganzen Zelle verteilt ist, wohingegen CD37a-eGFP klare Lokalisationsmuster in kleinen Vesikeln aufwies (Abb. 3.32). Wahrscheinlich fehlt der CD37b Isoform ein Lokalisationssignal, das CD37 normalerweise an seinen vorhergesehenen Ort innerhalb der Zelle leiten würde.

Bei den Analysen fiel auf, dass die Ansätze mit transduzierten FaDu-Zellen stets zwei distinkte Populationen aufwiesen, von denen eine schwach eGFP positiv und eine stark eGFP positiv war. Wie in der Diskussion näher erörtert, beruht dieser Effekt mutmaßlich auf einem exosomalen Transfer der Fusionsproteine. In den Ansätzen mit CD37a-, CD53- und CD63-eGFP transduzierten FaDu-Zellen konnten die Tetraspanin-Fusionsproteine durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. In den übrigen Ansätzen kann nicht deutlich zwischen endogener Tetraspaninexpression und der Expression von Tetraspanin-Fusionsproteinen diskriminiert werden.

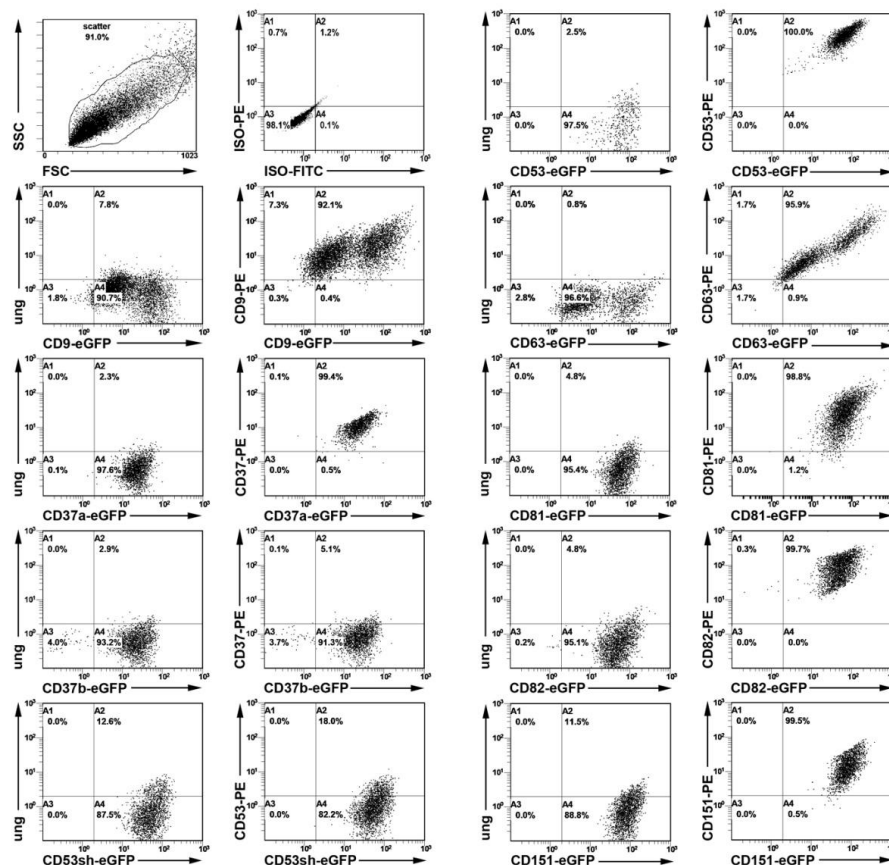


Abb. 3.25: Durchflusszytometrische Analysen von N-KM-Zellen, die stabil mit verschiedenen Tetraspanin-eGFP Fusionsproteinen transduziert wurden.

Es sind die Messungen an Tetraspannin-eGFP transduzierten Zellen jeweils vor und nach AK-Färbung dargestellt. Es wurden Isotyp-AK und entsprechende AK gegen die jeweils transduzierten Tetraspannin-Fusionsproteine für die extrazelluläre Färbung der Zellen verwendet.

Die gefärbten CD9-, CD37a-, CD53-, CD63-, CD81-, CD82- und CD151-eGFP transduzierten Zellen wiesen mit steigender eGFP-Intensität eine steigende PE-Intensität auf. CD53s-eGFP und CD37b-eGFP transduzierte Zellen wiesen nach der Färbung aus den bereits genannten Gründen kein PE-Signal auf (Abb. 3.25). Alle Ansätze der stabil transduzierten N-KM Zellen, bis auf CD53s- und CD37b-eGFP, wiesen mit steigender eGFP-Intensität eine steigende PE-Intensität auf. Die entsprechenden Antikörper haben an die Fusionsproteine gebunden.

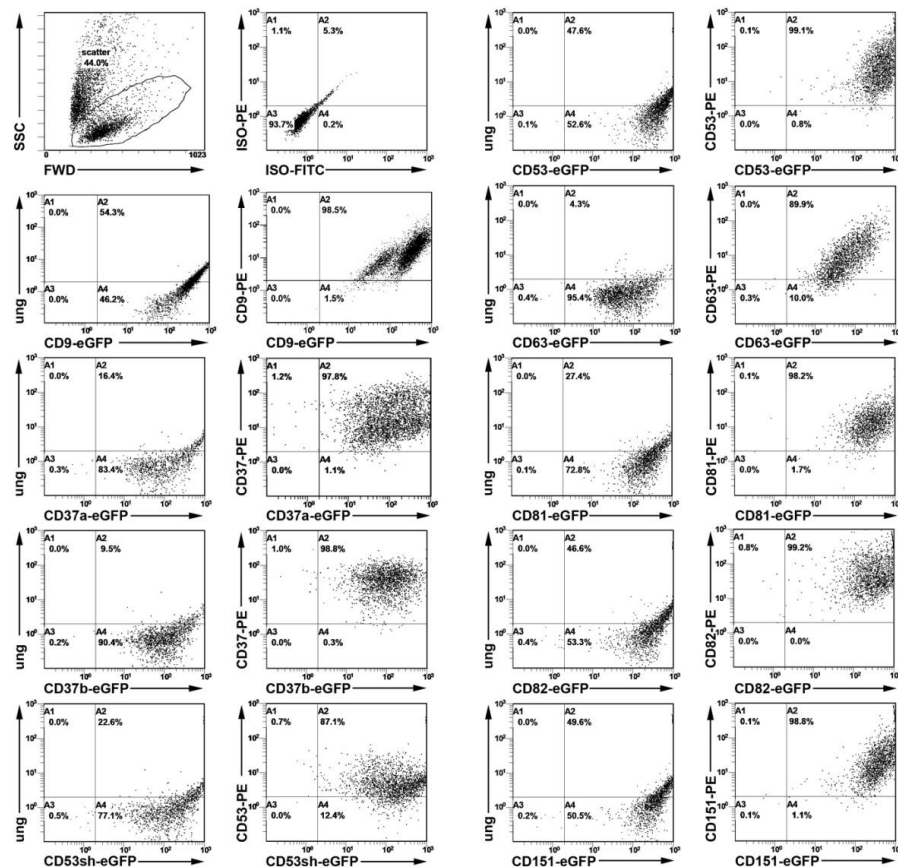


Abb. 3.26: Durchflusszytometrische Analysen von THP1-Zellen (Monozyten), die stabil mit verschiedenen Tetraspannin-eGFP Fusionsproteinen transduziert wurden.

Es sind die Messungen an Tetraspannin-eGFP transduzierten Zellen jeweils vor und nach AK-Färbung dargestellt. Es wurden Isotyp-AK und entsprechende AK gegen die jeweils transduzierten Tetraspannin-Fusionsproteine für die extrazelluläre Färbung der Zellen verwendet. Die dargestellten Messungen wurden an THP1-Zellen in Suspension durchgeführt.

Bis auf die Ansätze mit CD37a-, CD37b-, CD53s- und CD82-eGFP wiesen die transduzierten und gefärbten THP1-Zellen mit steigender eGFP-Intensität eine steigende PE-Intensität auf (Abb. 3.26). Im Abgleich mit den Analysen von transduzierten FaDu- und NK-M-Zellen sowie nicht manipulierten THP1-Zellen, kann davon ausgegangen werden, dass in den CD37b-eGFP und CD53s-eGFP Ansätzen transduzierter THP1-Zellen die verwendeten Antikörper mit den endogen exprimierten Tetraspaninen CD37 und CD53 reagiert haben. CD37b-eGFP wird aus den bereits genannten Gründen wahrscheinlich nicht an die Zelloberfläche transportiert. CD53s wurde, wie bereits erwähnt, nicht mit den verwendeten AK detektiert. CD37a-eGFP transduzierte Zellen wiesen nach der Färbung mit entsprechenden PE-Antikörpern zwei Populationen auf, die unterschiedlich stark in den PE-Messbereich verschoben waren. Die stärker PE positive Population lässt sich auf die endogene Expression von CD37 an der Oberfläche von THP1-Zellen zurückführen. Es ist aber auch eine zweite Population zu sehen, die eine gleich starke eGFP-Signalintensität aufweist, aber deren PE-Signalstärke schwächer als die der ersten Population ist. Mutmaßlich interferiert hier das CD37a-eGFP Fusionsprotein mit der endogenen Expression von CD37 bzw. mit dessen Nachweisbarkeit an der Oberfläche von transduzierten Zellen. Möglicherweise beeinträchtigt das Fusionsprotein die intrazelluläre Lokalisation von endogen exprimierten CD37 in THP1-Zellen. Bei CD82-eGFP transduzierten Zellen liegt, wie in der Diskussion näher erörtert, möglicherweise eine Internalisierung der Fusionsproteine vor. Die Zellen, die mit CD9-, CD53-, CD63-, CD81- und CD151-eGFP transduziert waren, wiesen mit steigender eGFP-Intensität eine steigende PE-Intensität auf. In diesen Ansätzen haben die verwendeten Antikörper an das entsprechende Fusionsprotein gebunden.

Mit den durchgeführten durchflusszytometrischen Messungen sollte hier ausschließlich die Expression der Tetraspanin-Fusionsproteine nachgewiesen werden. Aufgrund der aufgetretenen unterschiedlichen Populationen, wie z.B. bei CD81- und CD151-eGFP transduzierten und gefärbten FaDu-Zellen, waren diese Analysen nur teilweise aussagekräftig genug, um eine Expression der Fusionsproteine an der Zelloberfläche zu bestätigen. CD37b-eGFP und CD53s-eGFP wurden in keinem Ansatz detektiert. In diesen Fällen ist es möglich, dass die Fusionsproteine nicht an die Zelloberfläche transportiert werden oder dass die Antikörper nicht mit den Fusionsproteinen interagieren. Zum weiteren Nachweis der verschiedenen Tetraspanin-Fusionsproteine

wurden Western-Blot-Analysen exemplarisch von Zelllysaten transduzierter N-KM Zellen angefertigt (siehe folgenden Abschnitt 3.6.4).

3.6.4 Proteinbiochemische Analysen stabil transduzierter Zellen

Um die erwartete Größe, Integrität und Expression der Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine weiter zu überprüfen, wurden proteinbiochemische Analysen durchgeführt. Hierfür wurden Western Blot-Untersuchungen exemplarisch mit Zelllysaten von N-KM Zellen angefertigt, die stabil verschiedene Tetraspanine als eGFP-Fusionsproteine exprimieren (Abb. 3.27). Zu diesem Zweck wurden etwa 1×10^6 N-KM-Zellen, die mit den verschiedenen Tetraspanin-Fusionsproteinen transduziert waren, geerntet und lysiert. Der Proteingehalt wurde bestimmt. Es wurden 20 µg Gesamtprotein von jeder transduzierten N-KM-Zelllinie aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.7.1). Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Nun wurden pro Membran jeweils zwei verschiedene Nachweisreaktionen sequentiell durchgeführt. Die Zuordnungen der ersten und zweiten Nachweisreaktionen für jede Membran sind in Tabelle 3.10 aufgelistet. Auf jeder Membran wurden alle Tetraspanin-eGFP und eGFP transduzierten Zelllinien sowie nicht-manipulierte Zellen untersucht.

Tab. 3.11: Zuordnungen der Antikörperdetektionen auf den Western Blot Membranen.

1. Antikörperdetektion		2. Antikörperdetektion	
CD9	(24 kDa)	Aktin	(42 kDa)
CD53	(35-42 kDa)	CD82	(50-53 kDa)
CD81	(26 kDa)	CD37	(40-52 kDa)
CD151	(27 kDa)	CD63	(40-60 kDa)

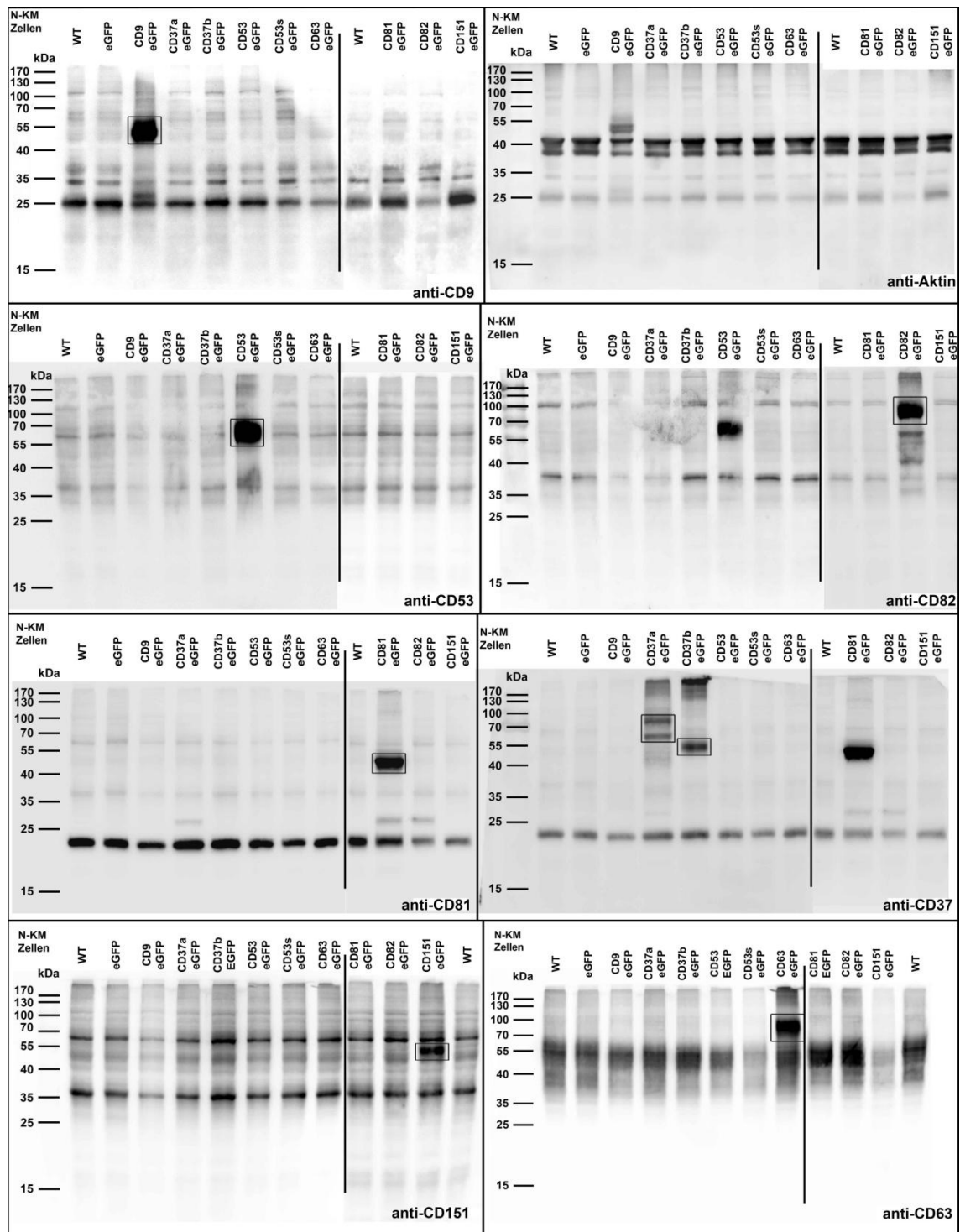


Abb. 3.27: Western Blot Analysen zum Nachweis von Tetraspanin-eGFP Fusionsproteinen und Aktin.

Auf den PVDF-Membranen wurden Aktin, nativ exprimierte Tetraspanine und die Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine detektiert. Reste der ersten Antikörperdetektion (Abbildungen links) waren auf den nachfolgenden Analysen (Abbildungen rechts) aufgrund unvollständiger HRP-Inaktivierungen verblieben. Jeweils die letzten vier Reihen eines Blots waren auf einer separaten Membran und wurden bildtechnisch zugefügt.

Um die konjugierte *Horseradish-peroxidase* (HRP) des sekundären Antikörpers der ersten Nachweisreaktion zu inaktivieren, wurden die Membranen nach der ersten Nachweisreaktion mit einer 10 % Wasserstoffperoxidlösung behandelt. Damit dabei keine Epitope zerstört werden konnten, wurden kurze Inkubationszeiten gewählt. Aufgrund der kurzen Inkubationszeiten kam es mitunter zu unvollständigen HRP-Inaktivierungen. Dadurch waren Restsignale der ersten Nachweisreaktionen (anti CD9, CD53, CD81 und CD151) auf den Membranen während der zweiten Nachweisreaktionen verblieben. Es ist jeweils eine Bande für das native Tetraspanin, sofern es in den Zellen exprimiert war, sowie eine Bande für das Tetraspanin-eGFP-Fusionsprotein bei der entsprechend transduzierten Zelllinie zu sehen (Abb. 3.27). Die Fusionsproteine sind jeweils um den eGFP-Fusionsanteil (eGFP = 27 kDa) größer. Die Banden von CD63 sind als Schmier zu sehen. Dieser Effekt wird mutmaßlich durch unterschiedliche posttranslationale Glykosylierungen verursacht und wurde bereits beschrieben (Metzelaar et al. 1991; Engering et al. 2003). Die Banden von nativ exprimiertem CD81 sind von ihrem Laufverhalten unterhalb der annotierten Größe (Andria et al. 1991; Levy et al. 1991). Dieser Effekt wurde mutmaßlich durch ein unterschiedliches Laufverhalten der Proben und dem Proteinstandard während der gelelektrophoretischen Auftrennung verursacht. Mit Ausnahme von CD53s-eGFP konnte nachgewiesen werden, dass alle Fusionsproteine erwartungsgemäß mit entsprechenden AK reagieren. Die Tetraspanin-Fusionsproteine sind damit proteinbiochemisch nachgewiesen worden. Das Molekulargewicht der nachgewiesenen Fusionsproteine entspricht den Erwartungen. Auch CD37b-eGFP wurde detektiert. Dies bedeutet, dass Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine persistent sind. CD37b-eGFP wird wahrscheinlich nicht an die Zelloberfläche transportiert, kann aber in Zelllysaten nachgewiesen werden. Die Tetraspanin-Fusionsproteine sind als zellbiologische Werkzeuge verwendbar.

3.7 Mikroskopische Analysen stabil transduzierter Zellen

Als nächstes wurde die subzelluläre Lokalisierung der verschiedenen Tetraspanin-Fusionsproteine untersucht. Zum weiteren Nachweis der Fusionsproteine wurden in einem ersten Ansatz die manipulierten Zellen mit AK gegen die entsprechenden Tetraspanine gefärbt. Da Tetraspanine mit dem endosomalen System assoziiert sind, wurden die manipulierten Zellen mit Markern für das frühe bzw. späte endosomale Kompartiment gefärbt. Tetraspanine sind in physiologische Prozesse wie Zellfusion,

Adhäsion und Endozytose involviert (Boucheix und Rubinstein 2001; Hemler 2003). Solche Prozesse gehen in der Regel einher mit Veränderungen der Morphologie des Zytoskeletts und der Zellmembran (Swanson 2008; Grant und Donaldson 2009). Durch die Ausbildung der *Tetraspanin Enriched Microdomains* (TEMs) haben Tetraspanine zudem membranorganisierende Eigenschaften (Hemler 2005; Levy und Shoham 2005). Um potentielle Auswirkungen der Tetraspanin-Fusionsproteine auf das Zytoskelett und die Zellmembran zu erkennen, wurden in den transduzierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz diese Zellkompartimente intrazellulär angefärbt.

3.7.1 Immunzytochemische Färbungen stabil transduzierter Zellen.

Um einen Effekt der Fixierung und Permeabilisierung auszuschließen, wurden zunächst die behandelten Zellen vor und nach diesen Verfahren mikroskopisch überprüft und mit nicht-manipulierten Zellen abgeglichen. Anschließend wurden die Verteilungsmuster der Fusionsproteine dokumentiert. Weiterhin wurde überprüft, ob entsprechende Antikörper an die Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine binden. Hierfür wurden transduzierte FaDu-, N-KM- und THP1-Zellen intrazellulär mit unkonjugierten Antikörpern, die gegen das jeweilige Tetraspanin gerichtet waren, gefärbt und mit sekundären Cy3-konjugierten Antikörpern nachgefärbt. (Abb. 3.29). Für eine erste Übersicht über die Lokalisationsmuster der zu analysierenden endosomalen Kompartimente wurden zunächst nicht-manipulierte Zellen intrazellulär gegen EEA1, Rab5, Rab7 und CD63 gefärbt und untersucht (Abb. 3.30). Nun wurden das frühe und späte endosomale Kompartiment intrazellulär in transduzierten FaDu-, N-KM- und THP1-Zellen angefärbt (Abb. 3.31 bis 3.40). Das frühe endosomale Kompartiment wurde mit Antikörpern gegen EEA1 und Rab5 angefärbt. Das späte endosomale Kompartiment wurde mit Antikörpern gegen Rab7 und CD63 angefärbt. Die Sekundärantikörper waren alle Cy3-konjugiert, so dass bei den mikroskopischen Analysen das eGFP-Signal der Fusionsproteine gegen das Cy3-Signal der sekundären Antikörper abgeglichen werden konnte. Das Zytoskelett wurde mit Antikörpern gegen β -Aktin und β -Tubulin angefärbt (Abb. 3.41 und 3.42). Die Plasmamembran wurde mit Antikörpern gegen CD81 angefärbt (Abb. 3.43). Die CD81-Färbung wies in Testfärbungen die detailreichste Darstellung der Zellmembran im Vergleich zu Färbungen mit CD29 und CD44 auf. CD81 ist zur Darstellung der Zellmembran in den untersuchten Zellen am besten geeignet. Sämtliche Analysen fanden im Abgleich mit

nicht-manipulierten Zellen, und Zellen, die nur mit dem Leseraster des eGFP transduziert waren, statt.

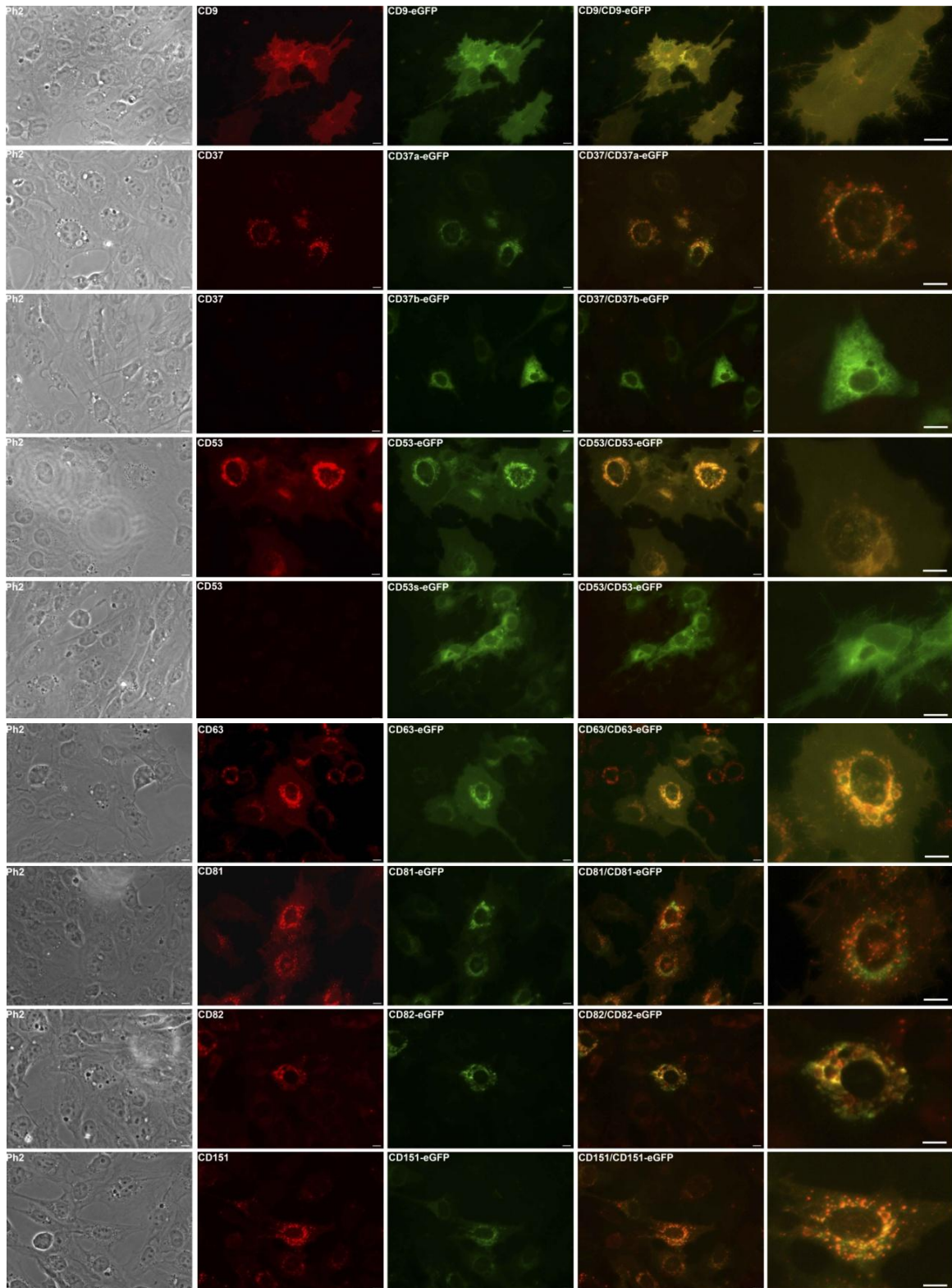


Abb. 3.28: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil die verschiedenen Tetraspanine exprimieren.

Transduzierte N-KM Zellen wurden intrazellulär mit AK gefärbt, die gegen entsprechende Tetraspanine gerichtet waren. In der rechten Spalte sind Bildbereichsvergrößerungen der Signalüberlagerungen zu sehen (Maßstabsbalken immer 10 μm).

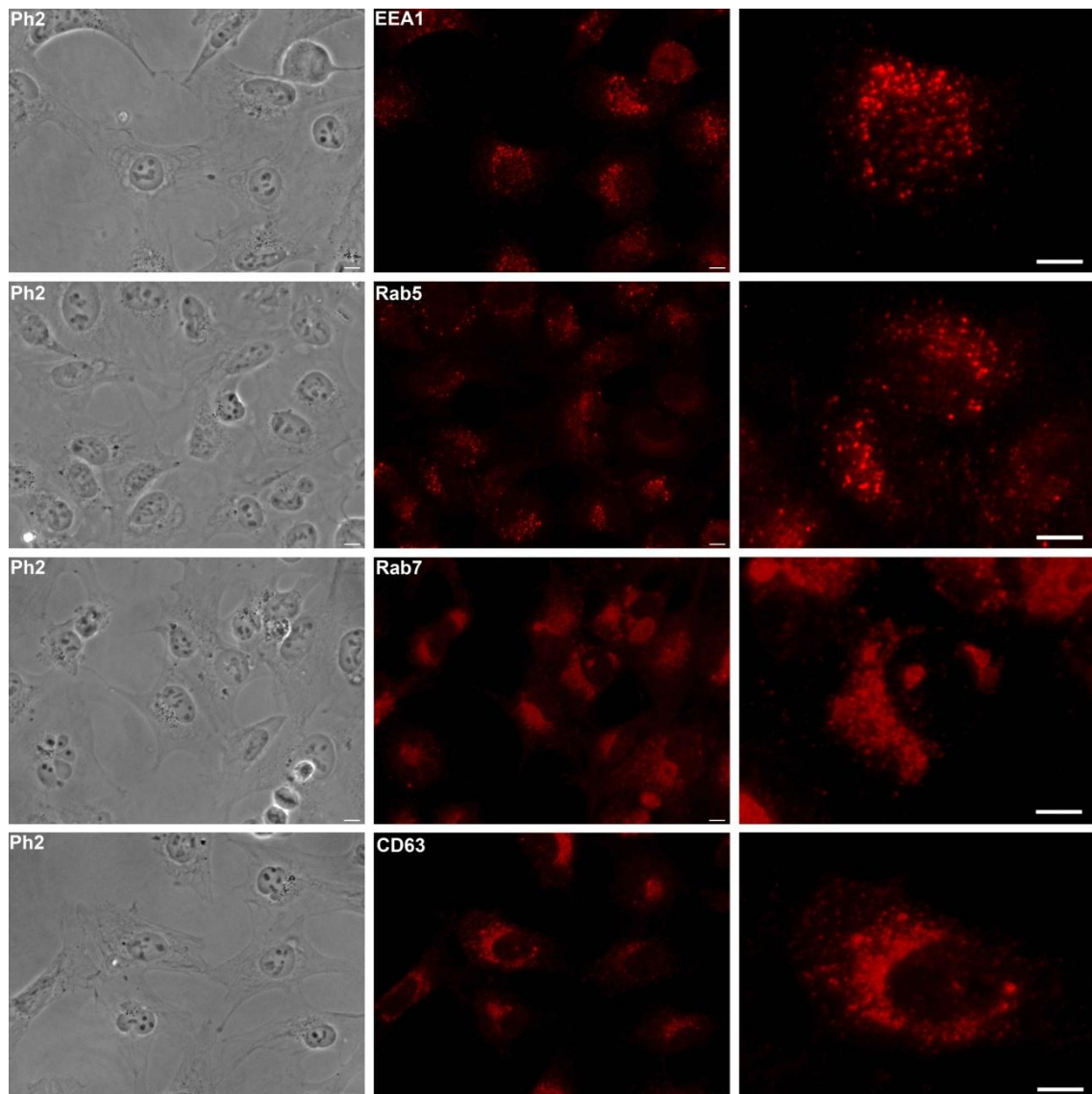


Abb. 3.29: Mikroskopische Aufnahmen von nicht-manipulierten Zellen.

Immunzytochemische Färbungen von frühem und spätem endosomalen Kompartiment in nicht-manipulierten N-KM Zellen. In der rechten Spalte sind Bildbereichsvergrößerungen der Färbungen zu sehen (Maßstabsbalken immer 10 μm).

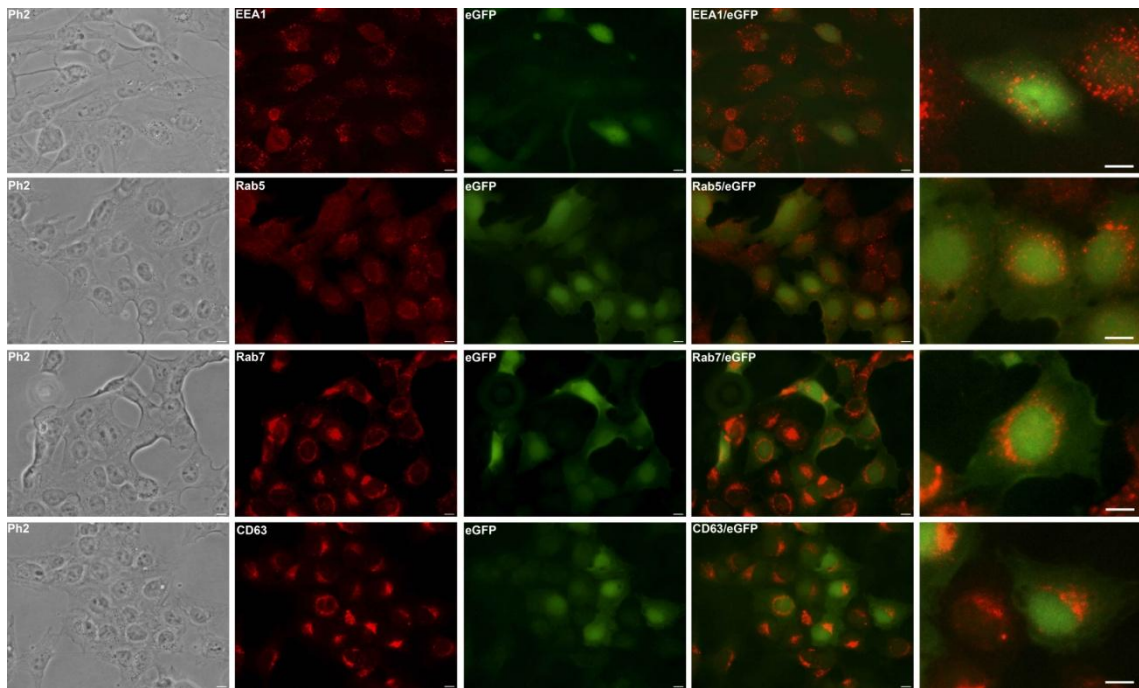


Abb. 3.30: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil eGFP exprimieren.

Immunzytochemische Färbungen von frühem und spätem endosomalen Kompartiment in eGFP transduzierten N-KM Zellen. In der rechten Spalte sind Bildbereichsvergrößerungen der Signalüberlagerungen zu sehen (Maßstabsbalken immer 10 µm).

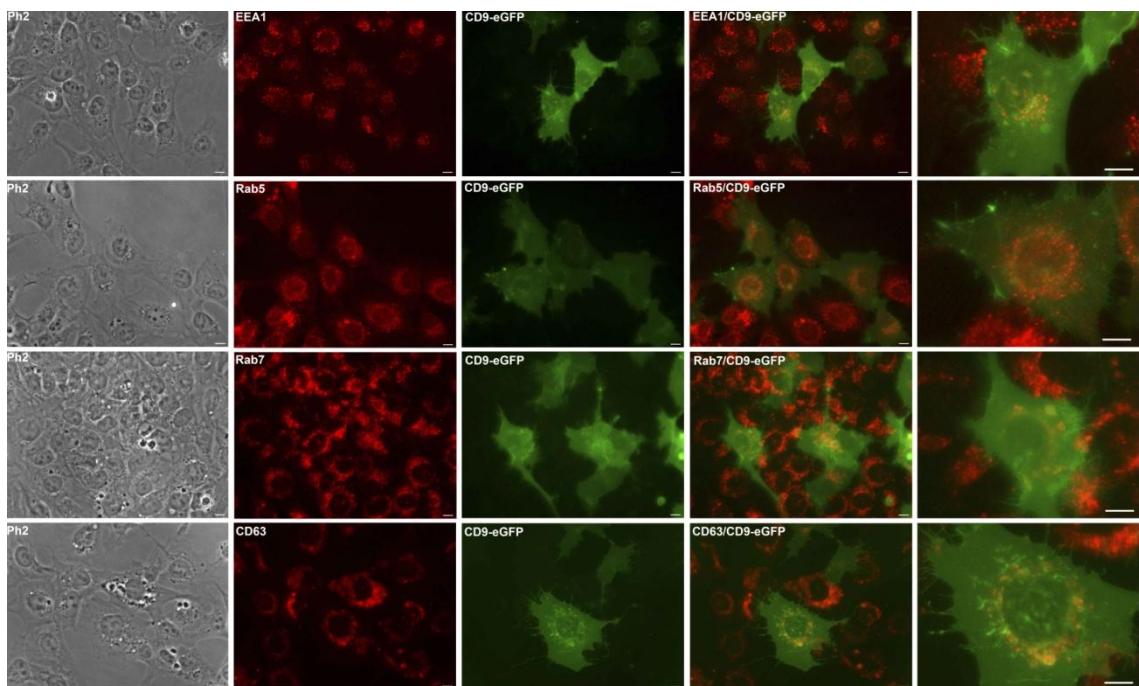


Abb. 3.31: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil CD9-eGFP exprimieren.

Immunzytochemische Färbungen von frühem und spätem endosomalen Kompartiment in CD9-eGFP transduzierten N-KM Zellen. In der rechten Spalte sind Bildbereichsvergrößerungen der Signalüberlagerungen zu sehen (Maßstabsbalken immer 10 µm).

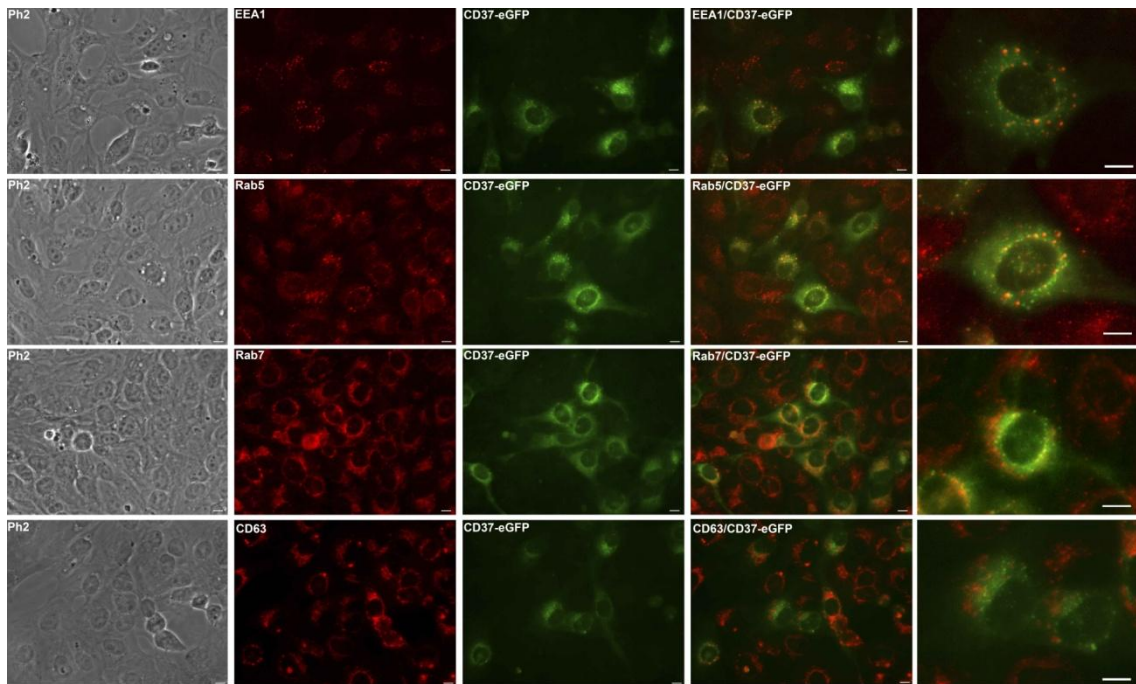


Abb. 3.32: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil CD37a-eGFP exprimieren.

Immunzytochemische Färbungen von frühem und spätem endosomalen Kompartiment in CD37a-eGFP transduzierten N-KM Zellen. In der rechten Spalte sind Bildbereichsvergrößerungen der Signalüberlagerungen zu sehen (Maßstabsbalken immer 10 µm).

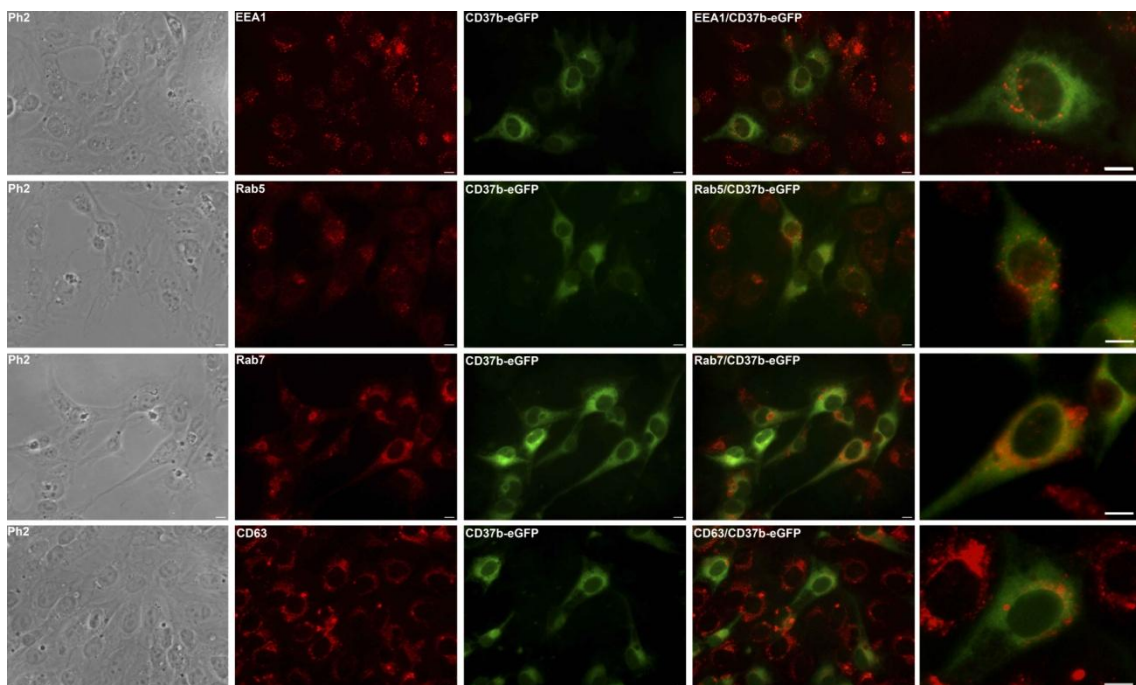


Abb. 3.33: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil CD37b-eGFP exprimieren.

Immunzytochemische Färbungen von frühem und spätem endosomalen Kompartiment in CD37b-eGFP transduzierten N-KM Zellen. In der rechten Spalte sind Bildbereichsvergrößerungen der Signalüberlagerungen zu sehen (Maßstabsbalken immer 10 µm).

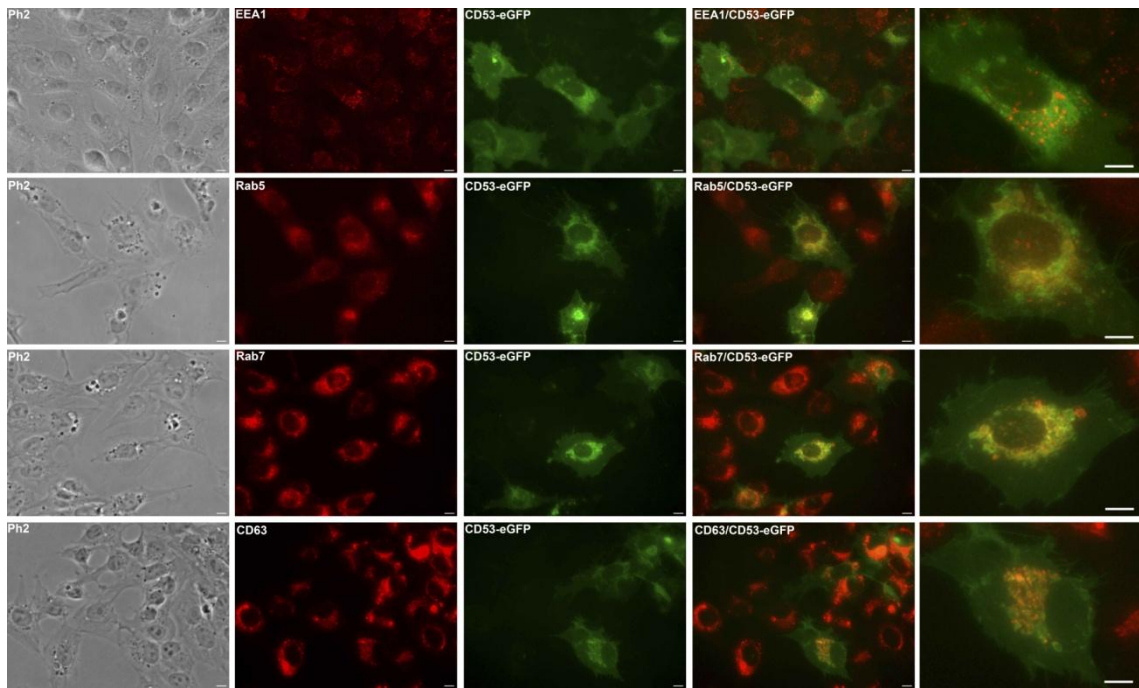


Abb. 3.34: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil CD53-eGFP exprimieren.

Immunzytochemische Färbungen von frühem und spätem endosomalen Kompartiment in CD53-eGFP transduzierten N-KM Zellen. In der rechten Spalte sind Bildbereichsvergrößerungen der Signalüberlagerungen zu sehen (Maßstabsbalken immer 10 µm).

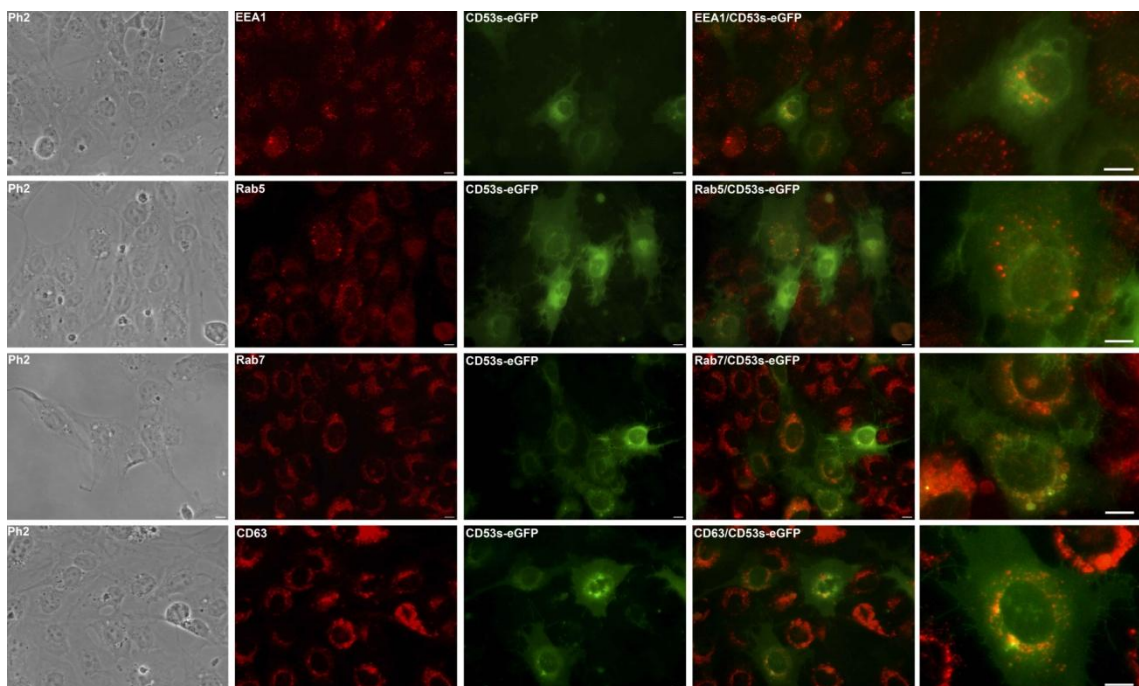


Abb. 3.35: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil CD53s-eGFP exprimieren

Immunzytochemische Färbungen von frühem und spätem endosomalen Kompartiment in CD53s-eGFP transduzierten N-KM Zellen. In der rechten Spalte sind Bildbereichsvergrößerungen der Signalüberlagerungen zu sehen (Maßstabsbalken immer 10 µm).

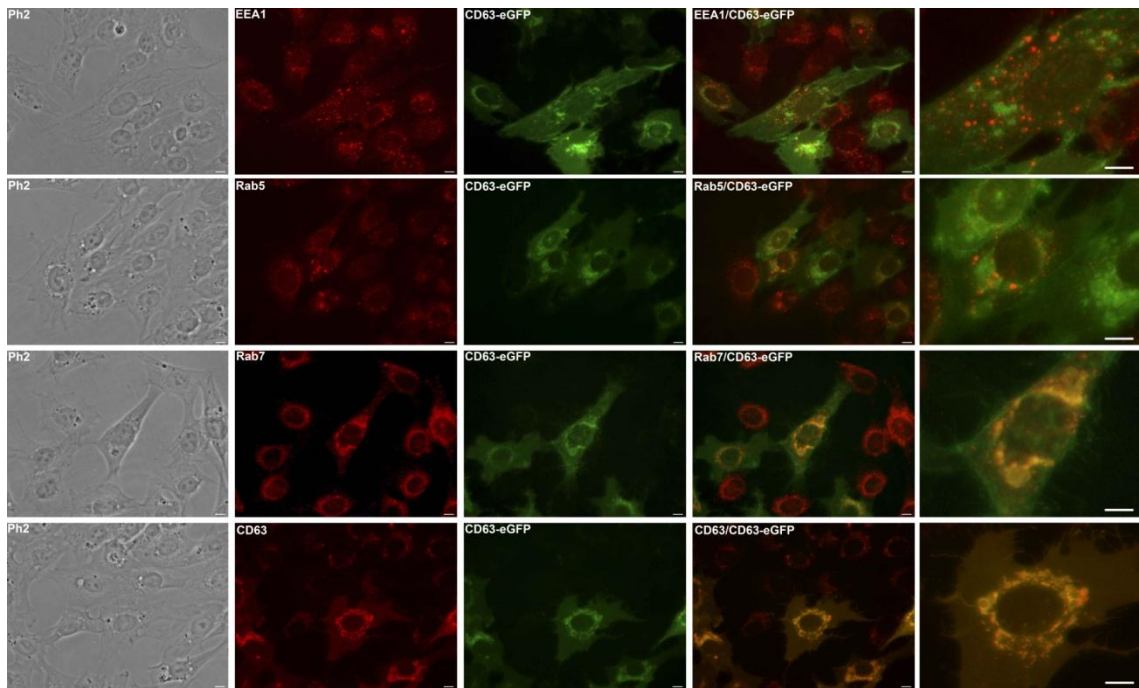


Abb. 3.36: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil CD63-eGFP exprimieren.

Immunzytochemische Färbungen von frühem und spätem endosomalen Kompartiment in CD63-eGFP transduzierten N-KM Zellen. In der rechten Spalte sind Bildbereichsvergrößerungen der Signalüberlagerungen zu sehen (Maßstabsbalken immer 10 µm).

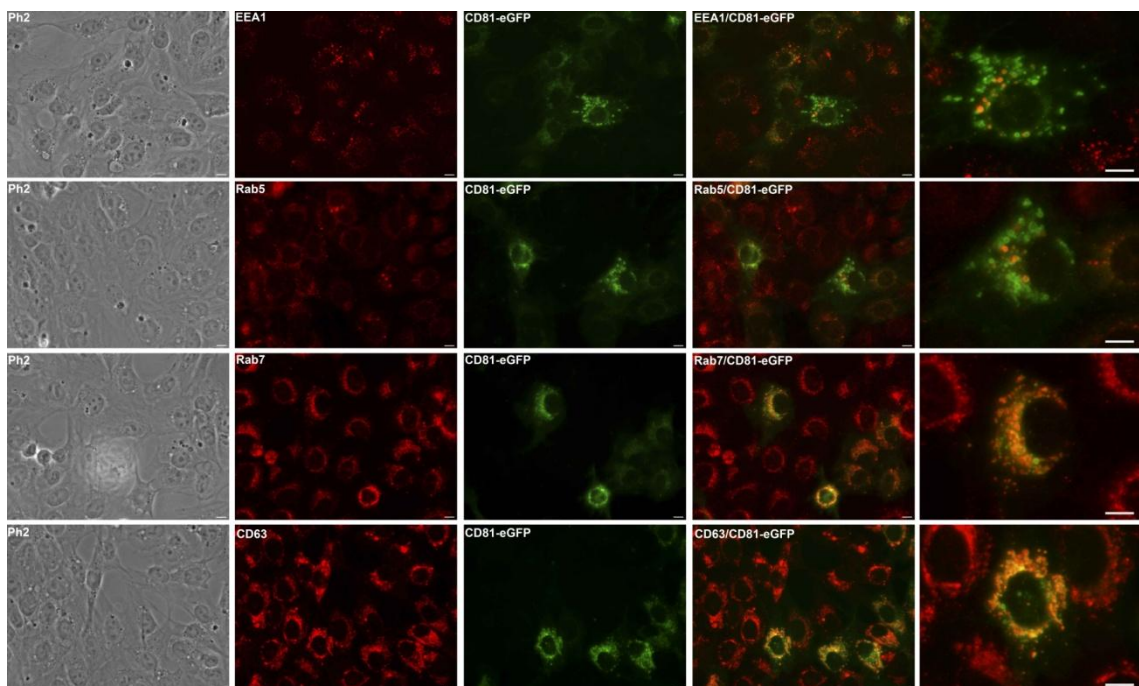


Abb. 3.37: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil CD81-eGFP exprimieren.

Immunzytochemische Färbungen von frühem und spätem endosomalen Kompartiment in CD81-eGFP transduzierten N-KM Zellen. In der rechten Spalte sind Bildbereichsvergrößerungen der Signalüberlagerungen zu sehen (Maßstabsbalken immer 10 µm).

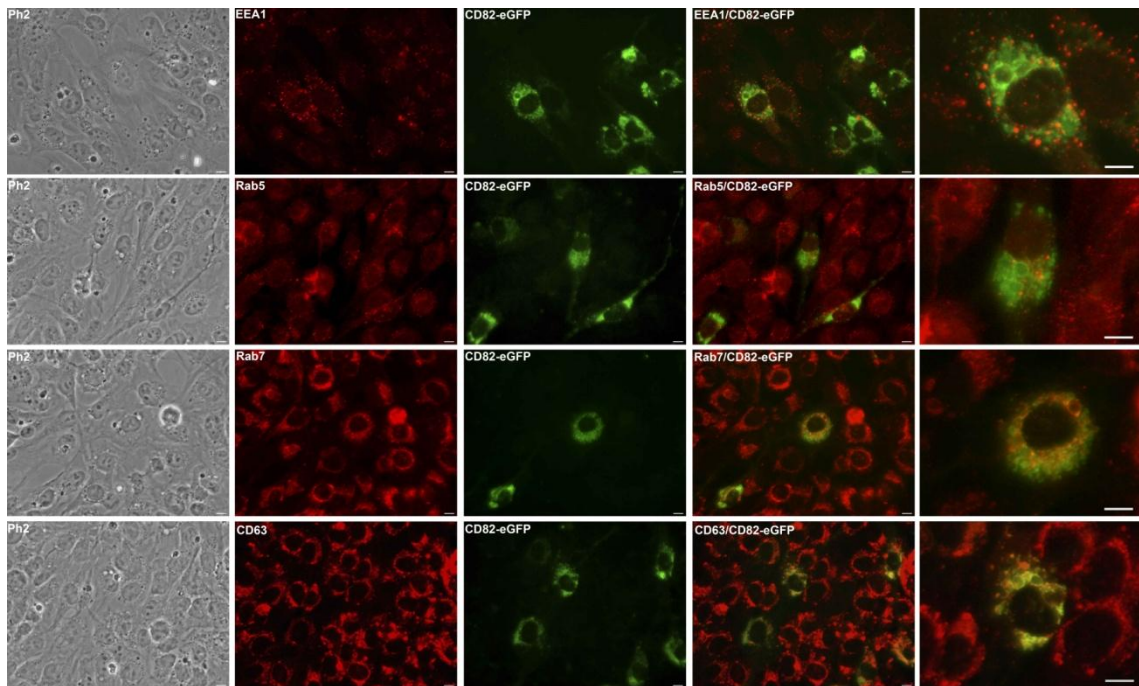


Abb. 3.38: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil CD82-eGFP exprimieren.

Immunzytochemische Färbungen von frühem und spätem endosomalen Kompartiment in CD82-eGFP transduzierten N-KM Zellen. In der rechten Spalte sind Bildbereichsvergrößerungen der Signalüberlagerungen zu sehen (Maßstabsbalken immer 10 µm).

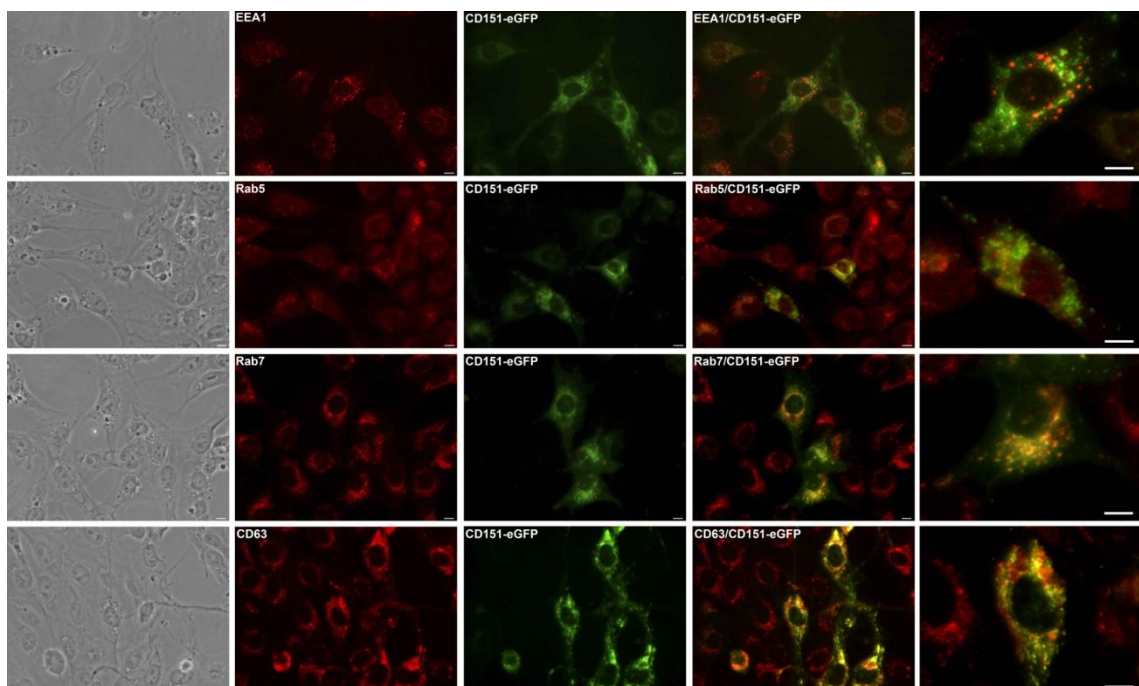


Abb. 3.39: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil CD151-eGFP exprimieren.

Immunzytochemische Färbungen von frühem und spätem endosomalen Kompartiment in CD151-eGFP transduzierten N-KM Zellen. In der rechten Spalte sind Bildbereichsvergrößerungen der Signalüberlagerungen zu sehen (Maßstabsbalken immer 10 µm).

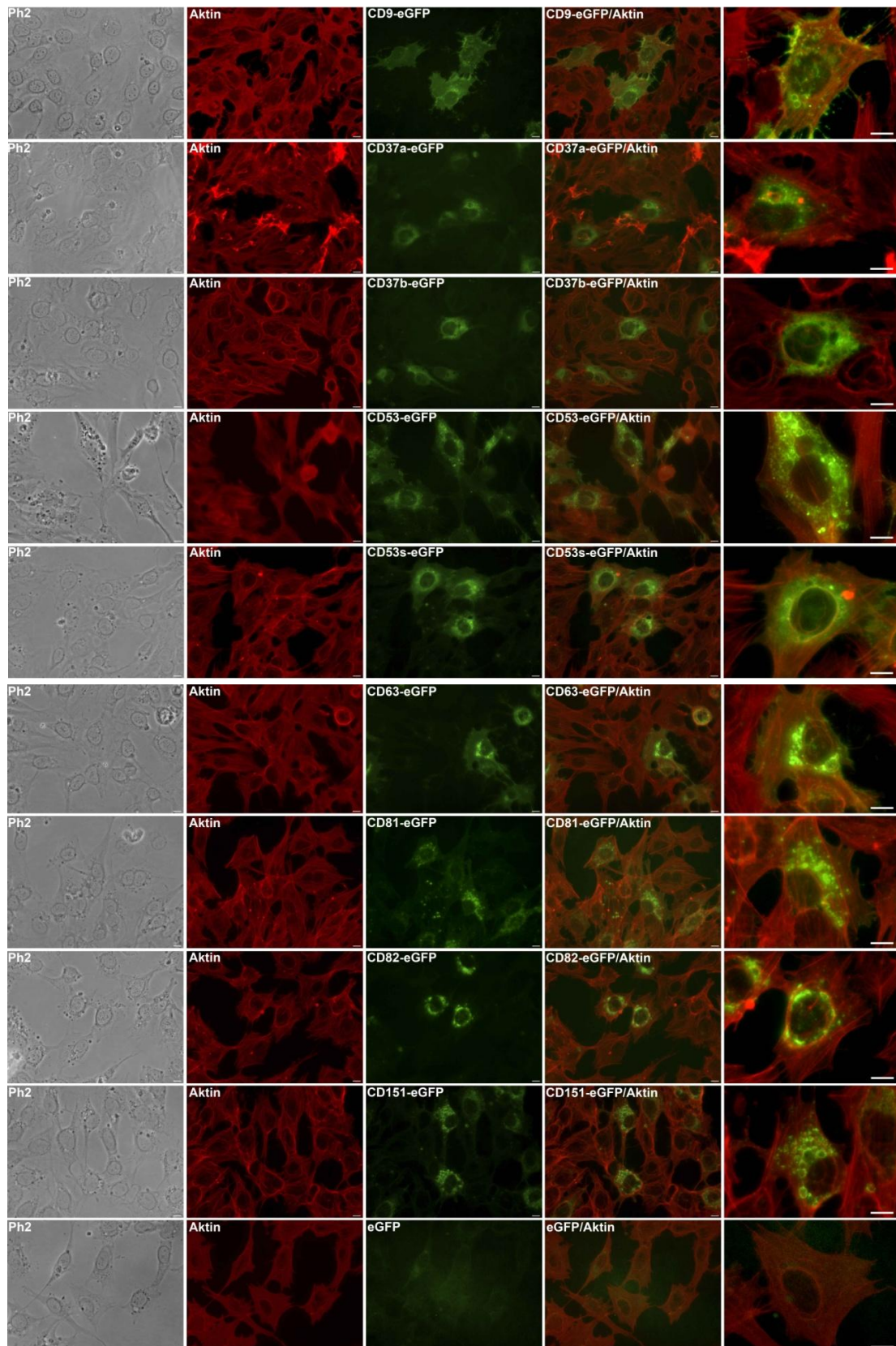


Abb. 3.40: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil Tetraspanin-Fusionsproteine exprimieren.

*Immunzytochemische Färbungen von Aktin in Tetraspanin-eGFP transduzierten N-KM Zellen.
In der rechten Spalte sind Bildbereichsvergrößerungen der Signalüberlagerungen zu sehen
(Maßstabsbalken immer 10 μm).*

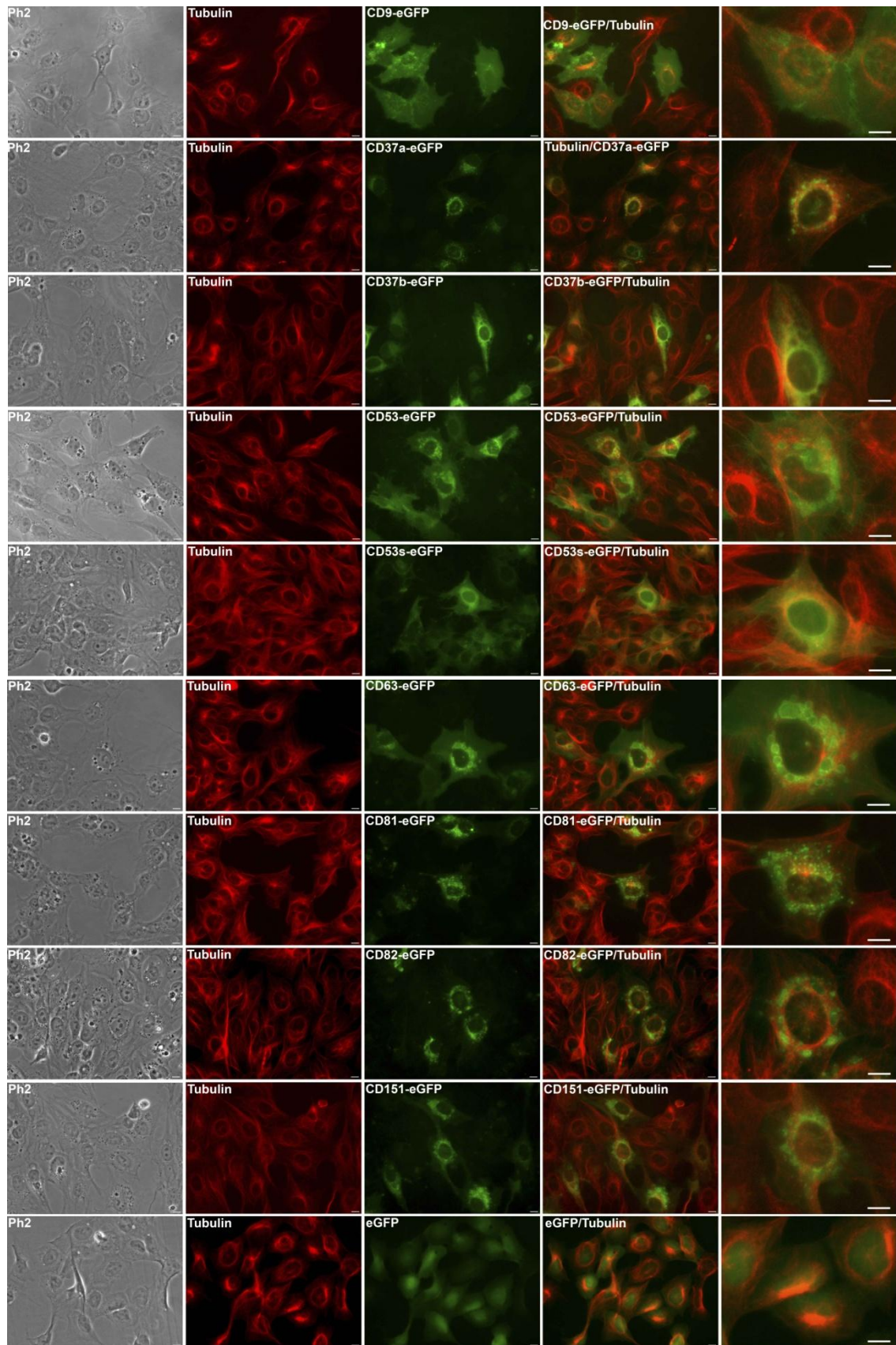


Abb. 3.41: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil Tetraspanin-Fusionsproteine exprimieren.

Immunzytochemische Färbungen von Tubulin in Tetraspanin-eGFP transduzierten N-KM Zellen. In der rechten Spalte sind Bildbereichsvergrößerungen der Signalüberlagerungen zu sehen (Maßstabsbalken immer 10 µm).

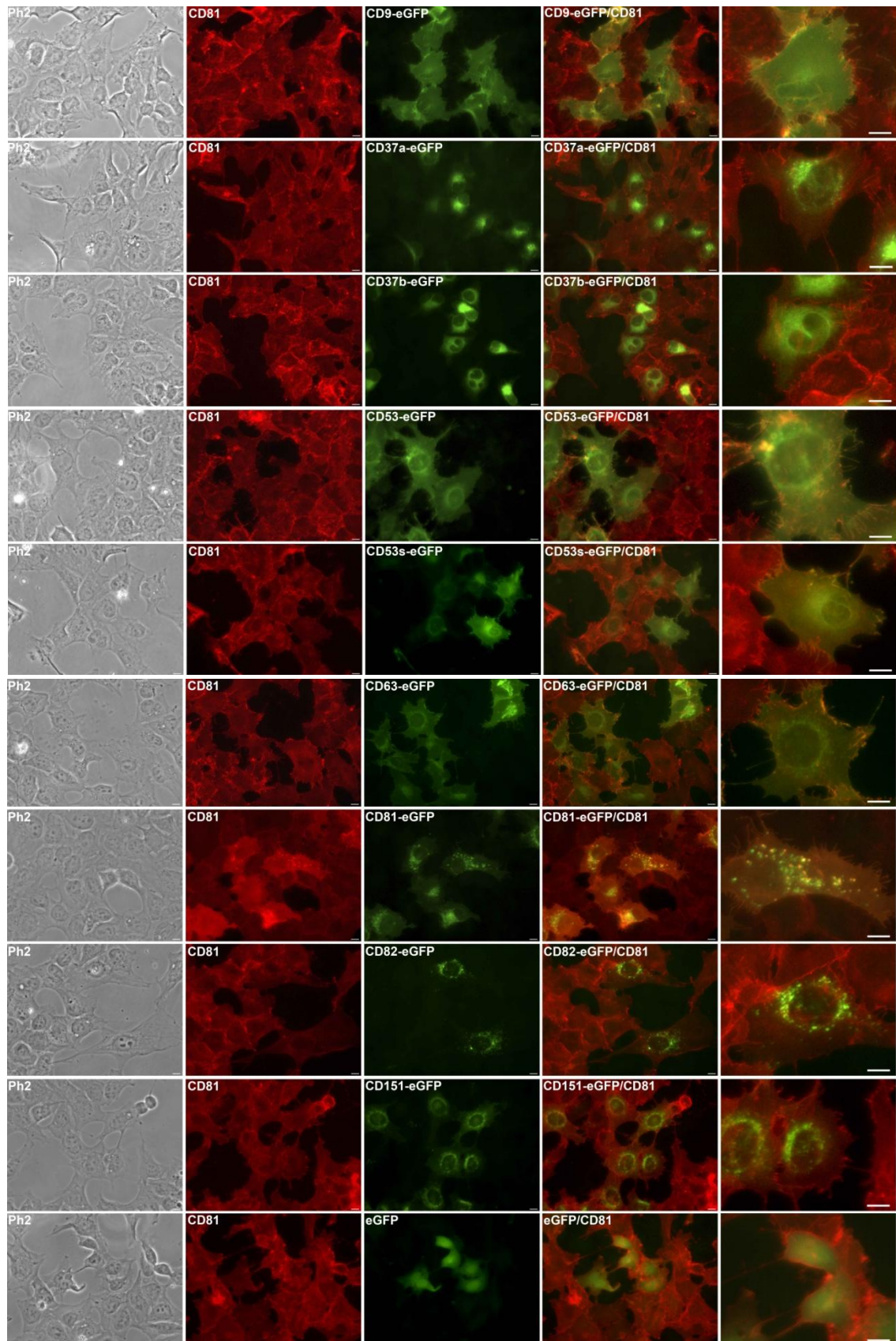


Abb. 3.42: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil Tetraspanin-Fusionsproteine exprimieren.

Immunzytochemische Färbungen von CD81 in Tetraspanin-eGFP transduzierten N-KM Zellen. In der rechten Spalte sind Bildbereichsvergrößerungen der Signalüberlagerungen zu sehen (Maßstabsbalken immer 10 µm).

Die verwendeten Zellen wiesen weder vor noch nach Fixierungs- und Permeabilisierungsprozessen Unterschiede zu nicht-manipulierten Zellen auf. Diese Methoden beeinflussen nicht die äußere Morphologie der Zellen. Zellen, die stabil Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine exprimieren, wiesen bei der mikroskopischen Begutachtung ebenso keine morphologischen Veränderungen gegenüber nicht-manipulierten Zellen auf. Alle Fusionsproteine, bis auf CD37b-eGFP und CD53s-eGFP, konnten mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden. Es waren in allen Zelllinien identische Muster bezüglich der subzellulären Verteilung der entsprechenden Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine beobachtbar. Die Analyse der subzellulären Verteilung der Tetraspanin-Fusionsproteine zeigt, dass CD9-, CD53s-, CD53- und CD63-eGFP Proteine eine starke Expression in der Plasmamembran aufweisen (Abb. 3.31; 3.34; 3.35; 3.36), während CD37a-, CD81-, CD82- und CD151-eGFP im Wesentlichen in vesikulären Strukturen zu finden sind (Abb. 3.32; 3.37; 3.38; 3.39). CD37b-eGFP war, ähnlich wie eGFP, diffus in der Zelle verteilt (Abb. 3.33). Da auch CD9-, CD53-, und CD63-eGFP in vesikulären Strukturen zu finden waren, wurde mittels intrazellulären Färbungen gegen EEA1, Rab5, Rab7 und CD63 bestimmt in welchen endosomalen Kompartiment entsprechende Vesikel zu finden sind. CD37a-, CD53-, CD53s- und CD63- und CD151-eGFP markierte Vesikel waren in der Regel klein im Vergleich zu den Vesikeln der CD82-eGFP Fusionsproteine. CD81-eGFP Fusionsproteine markierten sowohl große als auch kleinere Vesikel. Besonders auffällig war, dass stärker CD81-, CD82- oder CD151-eGFP exprimierende Zellen mitunter sehr große Vesikel aufwiesen. Vesikel der CD81- und CD151-eGFP Fusionsproteine waren teilweise prominent in Zellausläufern zu sehen, wohingegen die Vesikel der CD53-, CD53s-, CD63- und CD82-eGFP Fusionsproteine überwiegend perinukleär lokalisiert waren. Die Vesikel mit CD37a- und CD151-eGFP Fusionsproteinen waren immer sehr klein und zahlreich, wohingegen CD82-eGFP Fusionsproteine nur wenige große Vesikel markierten. Aus den immunzytochemischen Färbungen in Kombination mit den eGFP-Fluoreszenzsignalen ließen sich die subzellulären Verteilungsmuster klar in Bezug zu den endosomalen Kompartimenten setzen.

So waren die Überlagerungen der Signale von CD9-eGFP/Rab7 und CD9-eGFP/CD63 deckungsgleich, von CD9-eGFP/EEA1 oder CD9-eGFP/Rab5 aber nicht. Bei CD37a-

eGFP war dies umgekehrt: Hier waren die CD37a-eGFP/EEA1 und CD37a/Rab5 Signale übereinstimmend, aber nicht die Signalüberlagerung von CD37a-eGFP/Rab7 oder CD37a-eGFP/CD63. Im Besonderen sind die Signale von CD37a in transduzierten FaDu-Zellen sowohl mit den Markern des frühen, als auch des späten endosomalen Kompartiments deckungsgleich. Die Signale von CD37b-eGFP konnten nicht in Bezug zu den endosomalen Markern gesetzt werden, da das CD37b-eGFP-Signal diffus über die gesamte Zelle verteilt war. Die CD53s-, CD53-, CD63-, CD81-, CD82-, und CD151-Fusionsproteine waren alle kongruent mit den Rab7- und CD63-Signalen. Hier fiel im Besonderen auf, dass Vesikel von CD81-eGFP und CD151-eGFP transduzierten Zellen Kollokationen sowohl mit Markern des frühen, als auch mit Markern des späten endosomalen Kompartiments aufwiesen (Abb. 3.37 und 3.39). Dieser Effekt war in allen untersuchten Zellsystemen vorzufinden (Tab. 3.12 bis 3.14). Diese Kompartimente sind in der Regel nicht deckungsgleich. CD81-eGFP und CD151-eGFP markierte Vesikel waren hier deckungsgleich mit Markern des frühen und späten endosomalen Kompartiments. Mutmaßlich bedeutet dies, dass diese Tetraspanine die endosomale Sortierung entweder stören oder dass sie in die Sortierungsprozesse bzw. der Biogenese von Endosomen involviert sein könnten.

An den angefärbten Strukturen des Zytoskeletts (Aktin und Tubulin) waren in den stabil transduzierten Zellen keine Veränderungen gegenüber nicht-manipulierten Zellen zu erkennen.

Die Resultate der Analysen immunzytochemisch gefärbter N-KM-, FaDu- und THP1-Zellen, die stabil Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine exprimieren, sind zur Übersicht in den Tabellen 3.12, 3.13 und 3.14 zusammengefasst. Die Abbildungen der Färbungen von FaDu- und THP1-Zellen befinden sich im Anhang. Aus Platzgründen sind von diesen Zellen nur die Vergrößerungen der Signalüberlagerungen dargestellt.

Tab. 3.12: Zusammenfassung der Ergebnisse mikroskopischer Analysen an N-KM-Zellen, die Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine stabil exprimieren.

Kolokalisationen der Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine mit den endosomalen Kompartimenten sind grau unterlegt.

N-KM Zellen	Lokalisation der Fusionsproteine	frühes endos. Komp.		spätes endos. Komp.	
		EEA1	Rab5	Rab7	CD63
unbehandelt		0	0	0	0
eGFP	Zytoplasma	keine Kolok.	keine Kolok.	keine Kolok.	keine Kolok.
CD9-eGFP	Überwiegend Membran*	keine Kolok.	keine Kolok.	Kolokalisiert	Kolokalisiert
CD37a-eGFP	Vesikel	Kolokalisiert	Kolokalisiert	keine Kolok.	keine Kolok.
CD37b-eGFP	Zytoplasma*	keine Kolok.	keine Kolok.	keine Kolok.	keine Kolok.
CD53s-eGFP	Membran	keine Kolok.	keine Kolok.	Kolokalisiert	Kolokalisiert
CD53-eGFP	Membran + Vesikel	keine Kolok.	keine Kolok.	Kolokalisiert	Kolokalisiert
CD63-eGFP	Membran + Vesikel	keine Kolok.	keine Kolok.	Kolokalisiert	Kolokalisiert
CD81-eGFP	Vesikel	Kolokalisiert	Kolokalisiert	Kolokalisiert	Kolokalisiert
CD82-eGFP	Vesikel	keine Kolok.	keine Kolok.	Kolokalisiert	Kolokalisiert
CD151-eGFP	Vesikel	Kolokalisiert	Kolokalisiert	Kolokalisiert	Kolokalisiert

Tab. 3.13: Zusammenfassung der Ergebnisse mikroskopischer Analysen an FaDu-Zellen, die Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine stabil exprimieren.

Kolokalisationen der Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine mit den endosomalen Kompartimenten sind grau unterlegt.

FaDu Zellen	Lokalisation der Fusionsproteine	frühes endos. Komp.		spätes endos. Komp.	
		EEA1	Rab5	Rab7	CD63
unbehandelt		0	0	0	0
eGFP	Zytoplasma	keine Kolok.	keine Kolok.	keine Kolok.	keine Kolok.
CD9-eGFP	Überwiegend Membran*	keine Kolok.	keine Kolok.	Kolokalisiert	Kolokalisiert
CD37a-eGFP	Vesikel	Kolokalisiert	Kolokalisiert	Kolokalisiert	Kolokalisiert
CD37b-eGFP	Zytoplasma*	keine Kolok.	keine Kolok.	keine Kolok.	keine Kolok.
CD53s-eGFP	Membran	keine Kolok.	keine Kolok.	Kolokalisiert	Kolokalisiert
CD53-eGFP	Membran + Vesikel	keine Kolok.	keine Kolok.	Kolokalisiert	Kolokalisiert
CD63-eGFP	Membran + Vesikel	keine Kolok.	keine Kolok.	Kolokalisiert	Kolokalisiert
CD81-eGFP	Vesikel	Kolokalisiert	Kolokalisiert	Kolokalisiert	Kolokalisiert
CD82-eGFP	Vesikel	keine Kolok.	keine Kolok.	Kolokalisiert	Kolokalisiert
CD151-eGFP	Vesikel	keine Kolok.	keine Kolok.	Kolokalisiert	Kolokalisiert

Tab. 3.14: Zusammenfassung der Ergebnisse mikroskopischer Analysen an THP1-Zellen, die Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine stabil exprimieren.

Kolokalisationen der Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine mit den endosomalen Kompartimenten sind grau unterlegt.

THP1 Zellen	Lokalisation der Fusionsproteine	frühes endos. Komp.		spätes endos. Komp.	
		EEA1	Rab5	Rab7	CD63
unbehandelt		0	0	0	0
eGFP	Zytoplasma	keine Kolok.	keine Kolok.	keine Kolok.	keine Kolok.
CD9-eGFP	Überwiegend Membran*	keine Kolok.	keine Kolok.	Kolokalisiert	keine Kolok.
CD37a-eGFP	Vesikel	keine Kolok.	Kolokalisiert	keine Kolok.	keine Kolok.
CD37b-eGFP	Zytoplasma*	keine Kolok.	keine Kolok.	keine Kolok.	keine Kolok.
CD53s-eGFP	Membran	keine Kolok.	keine Kolok.	Kolokalisiert	Kolokalisiert
CD53-eGFP	Membran + Vesikel	keine Kolok.	keine Kolok.	Kolokalisiert	Kolokalisiert
CD63-eGFP	Membran + Vesikel	keine Kolok.	keine Kolok.	Kolokalisiert	Kolokalisiert
CD81-eGFP	Vesikel	Kolokalisiert	Kolokalisiert	Kolokalisiert	Kolokalisiert
CD82-eGFP	Vesikel	keine Kolok.	keine Kolok.	Kolokalisiert	Kolokalisiert
CD151-eGFP	Vesikel	Kolokalisiert	Kolokalisiert	Kolokalisiert	Kolokalisiert

In allen Zelltypen konnte die Einteilung von CD9-, CD53-, CD53s- und CD63-eGFP Fusionsproteinen in membranständige Kompartimente, und CD37a-, CD81-, CD82- und CD151-eGFP Fusionsproteine in vesikuläre Strukturen aufrecht erhalten werden (Tab. 3.12; 3.13 und 3.14). Der Bezug der Fusionsproteine zu den endosomalen Kompartimenten war in den verschiedenen Zellen nahezu identisch. Im Unterschied zu den anderen Ansätzen wiesen CD151-eGFP transduzierte FaDu-Zellen keine Kolokalisationen der Fusionsprotein markierten Vesikel mit Markern des frühen endosomalen Kompartiments auf. CD9-eGFP transduzierte THP1-Zellen wiesen keine Kolokalisationen von Fusionsprotein-markierten Vesikeln mit angefärbtem CD63 auf. CD37a-eGFP transduzierte THP1-Zellen wiesen keine Kolokalisationen von Fusionsprotein markierten Vesikeln mit angefärbtem EEA1 auf. Besonders auffällig sind die Kolokalisationen von CD37a-eGFP und CD81-eGFP markierten Vesikeln sowohl mit dem frühen, als auch mit dem späten endosomalen Kompartiment in FaDu-Zellen. Kolokalisationen von CD81-eGFP und CD151-eGFP markierten Vesikel mit dem späten und dem frühen endosomalen Kompartiment wurden in N-KM und THP1-Zellen beobachtet.

Aufgrund der beobachteten Kolokalisationen in den Zelltypen mit unterschiedlicher Herkunft sind die Tetraspanine CD9, CD53, CD53s, CD63 und CD82 mit dem späten endosomalen Kompartiment assoziiert, wohingegen CD37a mit dem frühen endosomalen Kompartiment in Verbindung zu stehen scheint. CD81-eGFP und CD151-eGFP markierte Vesikel waren in den untersuchten Zelllinien, bis auf CD81-eGFP

transduzierten FaDu-Zellen, sowohl mit dem frühen, als auch mit dem späten endosomalen Kompartiment kolokalisiert. CD37b-eGFP war aufgrund der diffusen Verteilung der Fusionsproteine im Zytoplasma nicht deutlich zuzuweisen. Die Morphologie bezüglich der Plasmamembran und dem Zytoskelett der stabil exprimierenden Zellen war in allen Zellen identisch mit den Kontrollen. Die Überexpression der Fusionsproteine hatte in den untersuchten Zellen demzufolge keinen Einfluss auf die inneren und äußeren Strukturen dieser Kompartimente.

CD9-, CD81-, CD82- und CD151-eGFP Fusionsproteine weisen mit steigender eGFP-Intensität veränderte Lokalisationsmuster (atypische Vesikel) auf. CD37a-, CD81- und CD151-eGFP Fusionsproteine wiesen sowohl mit dem frühen, als auch mit dem späten endosomalen Kompartiment Kolokalisationen auf. Diese Kompartimente sind in der Regel exklusiv vorzufinden. CD9-eGFP Fusionsproteine sind überwiegend Membranständig lokalisiert. In den durchflusszytometrischen Analysen transduzierter CD34⁺ Zellen, wiesen die Ansätze mit den Tetraspaninen keine Veränderungen bezüglich der Dynamik der beobachteten Populationen auf. Die CD53- und CD53s-Ansätze wiesen eine höhere Mortalitätsrate von transduzierten, als auch nicht-transduzierten Zellen auf. Aufgrund dieser Ergebnisse eignen sich CD63-eGFP Fusionsproteine am besten um asymmetrische Zellteilungen in CD34⁺ Zellen mikroskopisch zu beobachten, und möglicherweise primitive von reiferen Zellen zu trennen.

4 Diskussion

Die Mechanismen, die die Selbsterneuerung und Differenzierung von humanen hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (HSVZ) kontrollieren und steuern, sind bislang nur maginal verstanden. Es ist aber bekannt, dass Transkriptionsfaktoren die Regulation der Selbsterneuerung und Differenzierung beeinflussen (Orkin 1995; Shivdasani und Orkin 1996; Tenen et al. 1997; Bhatia et al. 1999; Ichikawa et al. 2004; Novershtern et al. 2011). Auch wenn bereits einige Transkriptionsfaktoren identifiziert werden konnten, die diese Entscheidung essentiell steuern, ist davon auszugehen, dass weitere Faktoren an der Steuerung beteiligt sind. Mit dem Ziel, neue Faktoren zu identifizieren, wurden im Vorfeld dieser Arbeit vergleichende Genexpressionsanalysen von primitiven- und reiferen humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen, sowie reifen Blutzellen durchgeführt. Anhand dieser Analysen wurden Gene identifiziert, die in den primitiveren Zellfraktionen stärker exprimiert waren, als in den Zellfraktionen von reiferen Vorläuferzellen bzw. reifen Blutzellen. Aus diesen Genen wurden Kandidaten ausgewählt, im Besonderen Transkriptionsfaktoren, deren Einfluss auf den die Dynamik der CD34⁺ und CD133⁺ Populationen in HSVZ analysiert wurde. Die Kandidatengene wurden mittels lentiviralem Gentransfer stabil in frisch isolierte CD34⁺ Zellen eingebracht. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen durchflusszytometrisch bezüglich der Frequenz der eGFP-, CD34- und CD133- Populationen analysiert. Hierbei wurden 8 Transkriptionsfaktoren identifiziert, die die Anteile von CD34⁺ und CD133⁺ Fraktionen von kultivierten HSVZ über einen Zeitraum von 14 Tagen deutlich veränderten.

Des Weiteren war es von Interesse, ob Tetraspanine einen Einfluss auf die Entscheidung Selbsterneuerung *versus* Differenzierung ausüben. Es wurde bereits beschrieben, dass die Tetraspanine CD53 und CD63 asymmetrisch in ca. 20-30% sich teilender CD34⁺ Zellen verteilt werden (Beckmann et al. 2007; Giebel und Beckmann 2007). Die Familie der Tetraspanin-Proteine ist hoch konserviert. Aus diesem Grund wurden weitere Tetraspanine, die in der CD-Nomenklatur vorhanden sind (CD9, CD37, CD81, CD82 und CD151) in die Analysen mit einbezogen. Des Weiteren wurden die integralen Membranproteine Flotillin-1 (FLOT1) und Flotillin-2 (FLOT2) analysiert. FLOT1 und FLOT2 sind Organisatoren von Membranmikrodomänen und mit Polarisierungsprozessen von HSVZ assoziiert (Rajendran et al. 2009; Görgens et al. 2012), und beeinflussen möglicherweise die asymmetrische Zellteilung von HSVZ.

4.1 Effekte nach Überexpression stammzellspezifisch exprimierter Faktoren in CD34⁺ Zellen

Zunächst wurden die offenen Leseraster von ausgewählten Kandidatengenen in ein lentivirales System überführt, um damit CD34⁺-Zellen stabil zu transduzieren. Mit Hilfe der erstellten Plasmide konnten von allen Kandidatengenen lentivirale Überstände hergestellt werden. Die stabile Transduktion ermöglichte es, die Auswirkungen der überexprimierten Gene über einen langen Zeitraum zu beobachten. Die Methode des lentiviralen Gentransfers an sich hatte keine Auswirkungen auf Dynamik der untersuchten CD34⁺ und CD133⁺ Zellfraktionen. Die Ansätze mit den Genen *ATF2*, *ARNTLa*, *ARNTLb*, *ARNTL2*, *ELF1*, *FOXP1a*, *KLF10*, *LMO4*, *NFIB*, *PROX1* und *ZNF85* wiesen keine diskriminierbare eGFP⁺ Populationen auf. Ein Apoptose induzierender Effekt kann hier ausgeschlossen werden, da keine erhöhte Rate an toten Zellen in den Ansätzen zu beobachten war. Womöglich war die Transduktionseffizienz aufgrund einer unzureichenden Qualität und/oder Quantität der hergestellten Lentiviren bei diesen Ansätzen zu gering. Nach erfolgreichen Transduktionen von CD34⁺ Zellen wurde der Verlauf der Frequenz von CD34⁺ und CD133⁺ Zellen innerhalb der eGFP⁺ Populationen durchflusszytometrisch verfolgt. Eine veränderte Frequenz dieser Populationen gibt Aufschluss über das weitere Entwicklungspotenzial der manipulierten Zellen (Görgens et al. 2013). Auf diese Weise konnte ein Einfluss von Kandidatengenen auf die Qualität primitiver HSVZ aufgezeigt werden. Im Besonderen führte die Überexpression der Gene *SNAI2*, *SOX2*, *SOX9*, *SOX11*, *BHLHB2*, *CEBPD*, *KLF4* und *ZNF281* zu veränderten Dynamiken im Abgleich mit den Kontrollen bezüglich der CD34⁺ und CD133⁺ Populationen. Die Werte der transduzierten Zellen dieser Ansätze konnten, aufgrund ihrer veränderten Populationsdynamik über die gesamte Dauer der Kultur, in vier Gruppen eingeteilt werden, je nachdem in welcher Weise die Dynamik der Populationen abweichend war. Im Folgenden wird nur auf die Transkriptionsfaktoren *SNAI2*, *SOX2*, *SOX9*, *SOX11*, *BHLHB2*, *CEBPD*, *KLF4* und *ZNF281* mit Bezug auf entwicklungsbiologische Zusammenhänge näher eingegangen.

4.1.1 Gruppe A (SOX2, SOX11)

Transduzierte Zellen wiesen über den gesamten Zeitraum, im Vergleich mit den Kontrollen, eine erhöhte Frequenz an CD34⁺ und CD133⁺ Zellen auf.

SOX2

Die alleinige Überexpression von *SOX2* in HSVZ bewirkt die Aufrechterhaltung eines primitiven Phänotyps der transduzierten Zellen. Der prozentuale Anteil transduzierter Zellen nahm aber relativ schnell ab. Auch die absolute Zellzahl der betrachteten Populationen verringerte sich über den gesamten Zeitraum. Vermutlich sind diese Zellen im Zellzyklus arretiert. Ob *SOX2* transduzierte Zellen ein multipotentes Potential aufrecht erhalten, ist am besten mit CFC-Assays zu überprüfen. Des Weiteren ist es von Interesse, ob ein RNAi vermitteltes Ausschalten von *SOX2* die Arretierung des Zellzyklus möglicherweise aufhebt. In Magenepithelzellen führt die Überexpression von *SOX2* zu ähnlichen Effekten: Die manipulierten Zellen weisen eine erhöhte Apoptoserate auf und sind im Zellzyklus arretiert. Hierzu reprimiert *SOX2* Zellzyklus-regulierende Faktoren wie Cyclin D1 und p27 auf transkriptioneller Ebene (Otsubo et al. 2008). In undifferenzierten embryonalen Stammzellen ist *SOX2* essentiell für die Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung (Sarkar und Hochedlinger 2013).

SOX11

Die Dynamik der beobachteten Populationen von *SOX11* transduzierten Zellen deuten daraufhin, dass diese Zellen im Hinblick auf die Differenzierung eher primitiv bleiben. Bei den Expansionsraten zeigte sich aber, dass die CD34⁺ und CD133⁺ Zellen im Abgleich mit der Leervektor-Kontrolle nicht verändert waren. In CFC-Assays sollte weiterführend überprüft werden, ob *SOX11* transduzierte HSVZ in diesem Assay Kolonien ausbilden die auf einen erhöhten Anteil an primitiven Zellen schließen lässt. Es wurde bereits beschrieben, dass die *SOX11* Expression in malignen hämatologischen Erkrankungen erhöht ist. Dabei wirkt *SOX11* als Tumor-Suppressor (Brennan et al. 2009; Hide et al. 2009; Mozos et al. 2009; Gustavsson et al. 2010). In MSCs ist *SOX11* wichtig für die Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung. So wurde bereits beschrieben, dass der Expressionslevel von *SOX11* während der Kultur von MSCs abnimmt, und der *Knockdown* von *SOX11* zu einer erniedrigten Proliferationsrate und einer verminderter osteogenen Differenzierung von MSCs führt (Kubo et al. 2009; Larson et al. 2010). Im Gegensatz dazu fördert die *SOX11* Expression in neuronalen Vorläuferzellen die Differenzierung. In diesen Zellen reguliert *SOX11* als transkriptioneller Aktivator die Expression neuronaler Gene wie z.B. *Tubb3* und *Tuj1* (Bergsland et al. 2006).

4.1.2 Gruppe B (*BHLHB2*, *SNAI2*, *SOX9*)

Transduzierte Zellen wiesen über den gesamten Zeitraum im Abgleich mit den Kontrollen eine erhöhte Frequenz an $CD34^+$ Zellen und eine verminderte Frequenz an $CD133^+$ Zellen auf.

BHLHB2

Die Populationsdynamiken nach der Überexpression von *BHLHB2* in $CD34^+$ Zellen deuten auf eine Differenzierung in die erythro-myeloische Entwicklungsreihe hin. Auch die verringerte Expansion an $CD133^+$ Zellen deutet darauf hin. Mit CFC-Assays sollte dieser Effekt bestätigt werden. Mutmaßlich könnte ein RNAi vermittelter *Knockdown* von *BHLHB2* in HSVZ die auf diese Weise manipulierten Zellen verstärkt in die erythro-myeloische Entwicklungsreihe differenzieren lassen. *BHLHB2* wirkt als transkriptioneller Repressor (Boudjelal et al. 1997). Dabei vermittelt der Transkriptionsfaktor *BHLHB2* die Repression von Genen indem es an basale Transkriptionsfaktoren wie TBP und TFIIB bindet und parallel Histon-Deazetylasen rekrutiert. Die Histon-Deazetylasen vermitteln Histonmodifikationen, welche die Repression von Genen bewirken (Sun und Taneja 2000). Die Expression von *BHLHB2* ist in regulatorischen T-Zellen erhöht und *BHLHB2* defiziente Mäuse haben eine verminderte Anzahl an regulatorischen T-Zellen (Sun et al. 2001; Miyazaki et al. 2010). In diesen Arbeiten wurde gezeigt, dass *BHLHB2* für den langfristigen Erhalt von regulatorischen T-Zellen im Mausmodell essentiell ist. Eine weitere Arbeit konnte zeigen, dass die Überexpression des Maus-Homologs *Clast5* unter Kontrolle eines B-Zell spezifischen Promoters, die B-Zell Aktivierung und Differenzierung inhibiert (Seimiya et al. 2004).

SNAI2 (ehemals SLUG)

Die Proliferationswerte von transduzierten und nicht-transduzierten Zellen waren identisch. Es wurde eine geringe Transduktionseffizienz von unter 20% erreicht. Der Anteil an $eGFP^+$ Zellen verblieb konstant über die Zeit. Anhand der Expansionsraten könnte die Überexpression des transkriptionellen Repressors *SNAI2* (Hemavathy et al. 2000) eine verstärkte Aufrechterhaltung an MPPs oder eine verstärkte Differenzierung zu LMPPs verursachen. Diese Interpretation der Zellquantitäten sollte mit CFC-Analysen bestätigt werden. Zusätzlich sollte in weiteren Experimenten die Funktion von *SNAI2* mittels RNAi ausgeschaltet werden, um dessen Aufgabe in der Hämatopoese

weiter zu analysieren. *SNAIL2* ist essentiell für Entwicklungsprozesse während der Embryogenese. Dabei induzieren *Snail*-Gene eine phänotypische Veränderung der Zellen während der Gastrulation. Dieser Prozess wird als *epithelial-mesenchymal transition* (EMT) bezeichnet (Nieto 2002; Barrallo-Gimeno und Nieto 2005; Behr et al. 2005). *SNAIL2* wirkt dabei als transkriptioneller Repressor der Histondeacetylasen rekrutiert, welche das Chromatin modifizieren und auf diese Weise eine Repression von Genen bewirken (Hemavathy et al. 2000; Savagner 2001). Die EMT ist assoziiert mit dem Erhalt von primitiven Stammzellpopulationen in humanen malignen Epithelzellen (Mani et al. 2008; Guo et al. 2012; Nassour et al. 2012).

SOX9

Die Effekte auf die Expansion der beobachteten Zellpopulationen nach *SOX9*-Überexpression in HSVZ deuten auf einen Erhalt an MPPs hin. Diese Ergebnisse sollten *in-vitro* mit CFC-Assays bestätigt werden. In primitiven mesenchymalen Stammzellen (*mesenchymal stem-cells*, MSC) ist *SOX9* essentiell für die Differenzierung. (Lefebvre et al. 1997). Bei den beschriebenen Experimenten wirkt *SOX9* als trans-Aktivator der nachfolgenden Genexpression von *Col2a1* (Collagen II) als Marker der Knorpeldifferenzierung. Des Weiteren beeinflusst *SOX9* im Besonderen die osteogene und adipogene Differenzierung von MSCs, indem *SOX9* die Expression von CEBP-beta aktiviert (Stockl et al. 2013). Weiterhin spielt *SOX9* eine wichtige Rolle für die Geschlechtsbestimmung beim Menschen. Dabei steuert *SOX9* die Entwicklung der Gonadenanlagen beim männlichen Embryo in Richtung Testis (Foster et al. 1994; Kwok et al. 1995; De Santa Barbara et al. 1998). Diese Beispiele belegen, dass *SOX9* einen starken Einfluss auf Differenzierungsprozesse von primitiven Zellen hat.

4.1.3 Gruppe C (CEBPD, KLF4, ZNF281)

Transduzierte Zellen wiesen über den gesamten Zeitraum im Abgleich mit den Kontrollen eine verminderte Frequenz an CD34⁺ und CD133⁺ Zellen auf.

CEBPD (CEBP-Delta)

Die alleinige Überexpression von *CEBPD* in HSVZ bewirkt mutmaßlich eine Differenzierung der Zellen. Auch die verringerten Expansionsraten von CD34⁺ und CD133⁺ Zellen deuten auf dieses Ergebnis hin. Mutmaßlich differenzieren CEBPD transduzierte Zellen verstärkt zu EMPs. Dies kann am besten mit CFC-Assays überprüft

werden. CEBP-alpha aus der Familie der CEBP-Proteine ist maßgeblich an der Differenzierung von primitiven hämatopoetischen Zellen zu Granulozyten beteiligt, indem es die Expression des G-CSF Rezeptors, *ELA2* und *MPO* aktiviert (Scott et al. 1992; Radomska et al. 1998; Keeshan et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass nach Induktion mit dem Zytokinin Isopentenyladenin (IPA) die CEBPD Expression in myeloid-leukämischen HL-60 Zellen hochreguliert wird und die Zellen zu Granulozyten differenzieren (Ishii et al. 2005). In dieser Arbeit wurde CEBPD mittels RNAi in HL-60 Zellen ausgeschaltet. Dies führte dazu, dass diese Zellen nach IPA-Induktion nicht mehr zu Granulozyten differenzierten. In humanen Stammzellen des Limbus der Kornea reguliert CEBPD den Zellzyklus und die Selbsterneuerung dieser Zellen durch Aktivierung der Zellzyklusinhibitoren p27 und p57 (Barbaro et al. 2007).

KLF4

Ähnlich wie bei den Ansätzen mit *SOX2* war eine Abnahme der absoluten Anzahl transduzierter Zellen zu beobachten. Im Unterschied zu den *SOX2*-Ansätzen nahm hier aber der Anteil an $CD34^+$ Zellen ab. Mutmaßlich sind *KLF4* transduzierte $CD34^+$ Zellen ganz ähnlich wie *SOX2* transduzierte Zellen im Zellzyklus arretiert. CFC-Assays sind hier unabdingbar, um zu überprüfen ob *KLF4* transduzierte Zellen differenzieren oder die primitiven Eigenschaften von HSVZ beibehalten. Interessant wäre auch ein Experimenteller Ansatz, bei dem sowohl *SOX2*, als auch *KLF4* in $CD34^+$ Zellen überexprimiert werden. Allerdings müsste für dieses Experiment eines der beiden Gene mit einem anderen Reporterprotein versehen werden, da die verwendeten Konstrukte beide ein eGFP als Reporter verwenden. *KLF4* ist allgemein bekannt als einer der vier „Yamanaka-Faktoren“ (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, und *c-MYC*), mit deren Hilfe es möglich ist humane Fibroblasten zu *induced pluripotent stem cells* (iPS) zu reprogrammieren. Diese Zellen weisen die pluripotenten Eigenschaften von embryonalen Stammzellen auf (Takahashi et al. 2007). Es wurde schon beschrieben, dass zwei exogen exprimierte „Yamanaka-Faktoren“ ausreichen (*Oct4/KLF4* bzw. *Oct4/SOX2*), um iPS-Zellen zu generieren (Kim et al. 2008; Meng et al. 2011). Von einer kombinierten Überexpression von *SOX2* und *KLF4* ist bis lang nicht berichtet worden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine koordinierte Aktivität von verschiedenen KLF-Proteinen die regenerativen Eigenschaften von Zellen des zentralen Nervensystems regulieren, wobei *KLF4* Gene reprimiert, die für die Ausbildung von neuronalen Axonen essentiell sind. (Moore et al. 2009). Die Überexpression von *KLF4* bewirkt eine Arretierung des

Zellzyklus von epithelialen Zellen des Intestinums. Dabei aktiviert KLF4 die Expression des Zellzyklusinhibitors p21 und reprimiert die cyclin D1 Expression (Shie et al. 2000; Chen et al. 2003; Ghaleb et al. 2005). Weiterhin inhibiert KLF4 die Expression von Genen, die in die Protein- und Cholesterolbiosynthese involviert sind (Whitney et al. 2006).

ZNF281

Die Proliferationsrate der eGFP⁺ Zellen war deutlich erhöht im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen derselben Ansätze. Die verringerte Proliferation an CD133⁺ Zellen deuten auf eine induzierte Differenzierung der manipulierten Zellen zur EMP-Linie hin. Auch hier sollte mit CFC-Assays überprüft werden, in welche Entwicklungsreihe *ZNF281* überexprimierende Zellen differenzieren. Des Weiteren ist von Interesse ob ein Ausschalten von *ZNF281* in HSVZ die primitiven Eigenschaften der Zellen aufrecht erhalten kann (mehr MPPs), oder ob diese möglicherweise in eine andere Entwicklungsreihe differenzieren (mehr LMPPs). *ZNF281* ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor in embryonalen Stammzellen der Maus (Wang et al. 2006). Dabei reguliert das *ZNF281* Maus-Homolog *ZFP281* als transkriptioneller Aktivator die Expression des Homeobox-Transkriptionsfaktors NANOG (Wang et al. 2008). Ein RNAi vermitteltes ausschalten von *ZNF281* führte in humanen MSCs zu einer spontanen osteo-chondrogenen Differenzierung, und verminderte die Proliferationsrate der manipulierten Zellen. Die Überexpression von *ZNF281* in MSCs resultierte, wie in unseren Experimenten, in einer gesteigerten Proliferationsrate von transduzierten Zellen (Seo et al. 2013).

Die Versuche mit den Genen *ATF2*, *ELF1*, *FOXP1a*, *KLF10*, *LMO4*, *NFIB*, *PROX1* und *ZNF85* wiesen in allen Ansätzen trotz mehrfacher Erhöhung des Volumens der verwendeten viralen Überstände keine deutlich identifizierbare eGFP⁺ Population auf. Die gemessenen Werte bezüglich der eGFP-Fluoreszenz waren viel zu schwach, um aussagekräftige Daten bzw. eine Aufteilung in eGFP⁺ und eGFP⁻ Populationen zu erhalten, weshalb eine Diskussion von diesen Ansätzen nicht möglich ist. Die Daten befinden sich im Anhang. Andere Konstrukte, wie z.B. Die ID Gene oder die Tetraspanine, wiesen extrem hohe Transduktionsraten auf. Eine mögliche Ursache für diese großen Unterschiede könnte die IRES-Sequenz sein. Die IRES-Sequenz ermöglicht durch die Transkription einer bicistronischen mRNA die Translation von

zwei separaten Proteinen. Es wurde schon gezeigt, dass die Effizienz der Translation des zweiten Leserahmens von IRES-Konstrukten in vielen Fällen geringer ist, als die des Ersten Leserahmens (Davies und Kaufman 1992; Dirks et al. 1993). Zudem wurde bereits nachgewiesen, dass auch die Sequenz des ersten Leserahmens einer bicistronischen mRNA einen Einfluss auf die Translation des zweiten Leserahmens hat (Mizuguchi et al. 2000; Hennecke et al. 2001). Eine mögliche Alternative zur IRES-Sequenz stellt die Verwendung der 2A-Sequenz aus Piconaviren dar (Furler et al. 2001; Chinnasamy et al. 2006). Die 2A-Sequenz kodiert eine kurze Peptidkette, die posttranslational in den Wirtszellen proteolytisch geschnitten wird. Auf diese Weise liegen wieder zwei Proteine vor, die von einer mRNA codiert werden. Der Unterschied besteht darin, dass unter Verwendung der 2A-Sequenz die Proteine nach deren Expression getrennt werden.

Möglicherweise führt die Überexpression von *ATF2*, *ELF1*, *FOXP1a*, *KLF10*, *LMO4*, *NFIB*, *PROX1* und *ZNF85* zur Apoptose der transduzierten Zellen. Eine gesteigerte Anzahl an apoptotischen Zellen konnte anhand der Propidiumiodidfärbungen und im Abgleich mit anderen Ansätzen aber nicht beobachtet werden. Weiterhin ist es denkbar, dass die Transgene einen Einfluss auf die Virusproduzierenden HEK293T-Zellen ausüben, so dass diese möglicherweise keine Viruspartikel oder funktionell eingeschränkte Viruspartikel hervorbringen. Um dies zu überprüfen sollte man eine andere Zelllinie für die Virusproduktion verwenden. Hierfür würden sich HT1080-Zellen eignen, da diese es ermöglichen hohe Virustiter herzustellen (Rasheed et al. 1974; Cosset et al. 1995). Für eine erfolgreiche Virusproduktion müssen die Zellen welche später die Viren produzieren sollen mit drei Plasmiden transfiziert werden. Hohe DNA-Konzentrationen im Zytosol transfizierter Zellen können toxisch wirken (Holter et al. 1991; Stacey et al. 1993; Shimokawa et al. 2000). Um nicht drei Plasmide simultan zu transfizieren, bietet es sich an für die Virusproduktion spezifische Verpackungszelllinien, die stabil virale *gag-pol*- und *env*-Proteine exprimieren zu verwenden (Ory et al. 1996; Gerin et al. 1999).

Tetraspanine

Da Tetraspanine in weiterführenden Experimenten als molekularbiologische Werkzeuge verwendet werden sollen, wird hier im Besonderen auf die Auswirkungen der Überexpression der untersuchten Tetraspanine *CD9*, *CD37a*, *CD37b*, *CD53*, *CD53s*, *CD63*, *CD81*, *CD82* und *CD151* in HSVZ eingegangen. Tatsächlich wurden sehr hohe

Transduktionsraten mit den lentiviralen Überständen in CD34⁺ Zellen erreicht (siehe Anhang). Es wurden jedoch in jeweils drei unabhängigen Experimenten keine starken Veränderungen bezüglich der Anteile von CD34⁺ oder CD133⁺ Zellen über den Zeitraum von 14 Tagen beobachtet. Die Ansätze mit *CD53* und *CD53s* transduzierten Zellen wiesen jedoch einen erhöhten Anteil an toten Zellen auf. Es wurde bereits beschrieben, dass apoptotische neutrophile Granulozyten eine erhöhte *CD53* Expression aufweisen (Beinert et al. 2000). Obwohl mit den Tetraspanin-IRES Konstrukten eine hohe Transduktionseffizienz erreicht wurde, konnten keine deutlichen Veränderungen in den Populationsdynamiken über die gesamte Kulturdauer beobachtet werden. Im Hinblick auf die weiteren Versuche ist dies von Vorteil, da die Verwendung der Tetraspanine als Hilfsmittel zur Nachverfolgung von asymmetrischen Zellteilungen in HSVZ nur möglich ist, wenn diese die Entwicklung der Zellen nicht beeinflusst. Kann dies mit LTC-IC und CFC-Assays bestätigt werden, so eignen sich Tetraspanin-Fusionsproteine als Hilfsmittel, um asymmetrische Zellteilungen von lebenden HSVZ zu analysieren. Diverse Arbeiten beschreiben, dass Tetraspanine in der Hämatopoese eine wichtige Rolle spielen. So wurde das Repopulationspotential von CD34⁺ Zellen in immundefizienten Mäusen durch die Neutralisierung von CD9 mit CD9-inhibitorischen Antikörpern in diesen Zellen vermindert (Leung et al. 2011). Es wurde bereits beschrieben, dass CD9⁺, nicht aber CD9⁻ leukämische B- Zellen eine Tumorgenese im Knochenmark von seriell transplantierten immundefizienten Mäusen induzieren (Nishida et al. 2009). In Embryonalen Stammzellen ist CD9 stark exprimiert. Mit fortschreitender Differenzierung dieser Zellen nimmt die Expression von CD9 ab (Oka et al. 2002; Akutsu et al. 2009). Allerdings wird in diesen Arbeiten ausgeschlossen, dass CD9 eine funktionell an Differenzierungsprozessen beteiligt ist. Des Weiteren ist CD81 essentiell für den Erhalt des Lang-Zeit Repopulationspotentials von HSVZ in sekundär transplantierten und letal bestrahlten C57BL/6-Mäusen. Nach proliferativem Stress benötigten Cd81^{-/-} HSVZ länger um in den Ruhe-Status (*Quiescent State*) zu gelangen. Die Autoren folgern in dieser Arbeit, dass CD81-Mikrodomänen in HSVZ die Verteilung von Signalrezeptoren an der Membranoberfläche steuern, und auf diese Weise die Transduktion von extrinsischen Signalen in die Zelle gewährleisten (Lin et al. 2011). Das Tetraspanin CD82 ist in frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen und leukämischen Zellen stark exprimiert (Burchert et al. 1999). Auch CD63 hat die Eigenschaft Signalrezeptoren an der Oberfläche von HSVZ zu gruppieren. So wurde gezeigt, dass CD63 mit dem β_1 -Integrin einen Rezeptorkomplex bildet um die

Signaltransduktion von TIMP-1 zu gewährleisten. Durch die Bindung von TIMP-1 an diesen Komplex wird das β_1 -Integrin aktiviert, was die Adhäsions- und Migrationseigenschaften von $CD34^+$ Zellen verstärkt (Wilk et al. 2013).

4.1.4 Abweichende Daten von $CD133^+$ Populationen

Veröffentlichte Daten zeigten eine stete Abnahme des Anteils an $CD34^+CD133^+$ Zellen innerhalb einer Kulturdauer von sieben Tagen (Beckmann et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit war der Anteil von $CD133^+$ Zellen innerhalb der $CD34^+$ Population der Kontrollen relativ konstant bei 60%. Dies ist mutmaßlich auf die veränderte analytische Auswertung bei den durchflusszytometrischen Messungen zurückzuführen. Hierbei wurde die $CD133^+$ Population von $CD34^+$ Zellen bestimmt (Abb. 3.4). Auf diese Weise war es möglich die Dynamik der $CD133^+$ Populationen innerhalb der $CD34^+$ Zellen zu beobachten. Dabei nahm die zu analysierende Anzahl an $CD34^+$ Zellen mit fortschreitender Kulturdauer in der Regel ab, so dass auch die absolute Anzahl an $CD34^+CD133^+$ Zellen abnahm obwohl der Anteil von $CD133^+$ Zellen innerhalb der $CD34^+$ Population konstant blieb. Somit sind die beschriebenen Populationen wieder übereinstimmend mit den Ergebnissen von Beckmann et al. Des Weiteren war die Dynamik von Zellen in der Region „ $CD34/CD133$ “ identisch mit den Beobachtungen von Beckmann et al. Diese Region entspricht in etwa der $CD34^+CD133^+$ Population, welche von Beckmann et al. analysiert wurde.

4.2 Analyse von Tetraspanin-eGFP Fusionsproteinen

4.2.1 Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine als molekularbiologische Werkzeuge

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine als molekularbiologische Werkzeuge eignen. Anhand der durchflusszytometrischen Analysen von nicht-manipulierten N-KM-, FaDu- und THP1-Zellen wurde nachgewiesen, dass die Tetraspanine CD9, CD81 und CD151 auf der Oberfläche von allen untersuchten Zellen vorhanden waren. CD37 und CD53 waren exklusiv nur an der Oberfläche von THP1-Zellen, CD82 wurde nur auf FaDu- und THP1-Zellen nachgewiesen. FaDu-, N-KM- und THP1-Zellen wurden mit den Tetraspanin-eGFP Fusionskonstrukten transduziert und nach Kultivierung durchflusszytometrisch sortiert. Die durchflusszytometrischen Messungen der sortierten Zellen wiesen mehrere Populationen auf. So hatten alle transduzierten und ungefärbten FaDu-Zellen bei den

Messungen immer eine große Hauptpopulation neben einer kleineren Subpopulation bezüglich des eGFP-Signals. Diese Subpopulation lag bei allen Ansätzen, bis auf CD37a-eGFP und CD37b-eGFP, in dem fluoreszent-positiven Bereich. Diese Beobachtung wurde auch bei N-KM Zellen die mit CD9-eGFP und CD63-eGFP transduziert waren gemacht. Diese nicht-transduzierten Populationen waren in den Ansätzen wahrscheinlich aufgrund nicht stringenter Sortierungen vorhanden. Im Abgleich mit den Reanalysen der Zellsortierungen ist anzunehmen, dass diese Subpopulation ursprünglich kein eGFP-Signal aufwies. Mutmaßlich liegt hier ein Exosomen basierter Transfer der Fusionsproteine auf/in nicht-transduzierte Zellen vor. In unserer Gruppe war es bereits möglich aus Medienüberständen von CD63-eGFP und CD53-eGFP transduzierten Zellen eGFP-positive Partikel anzureichern. Nach der Applikation dieser Partikel zu nicht-manipulierten Zellen, wiesen diese in durchflusszytometrischen Messungen ein eGFP-Signal auf. Dass Tetraspanine auf Exosomen vorhanden sind wurde schon beschrieben, und tatsächlich dienen CD9, CD63 und CD81 als Markerproteine für Exosomen (Escola et al. 1998; Mathivanan und Simpson 2009). Nachdem die transduzierten Zellen mit entsprechend PE-konjugierten Antikörpern gefärbt wurden, konnte man beobachten, dass die kleineren Subpopulationen ebenfalls in den PE-positiven Bereich verschoben waren. Dies gilt nicht für die Subpopulationen der Ansätze mit CD37a-eGFP, CD37b-eGFP und CD53s-eGFP. Bei den gefärbten Ansätzen mit CD9-, CD81-, CD82- und CD151-eGFP transduzierten FaDu-Zellen kann die Verschiebung der kleineren Subpopulation in den PE-Messbereich auch auf die native Expression dieser Tetraspanine zurückzuführen sein. Die eGFP⁺ Hauptpopulationen waren nach der Färbung mit entsprechenden PE-konjugierten Antikörpern bis auf die Ansätze mit CD37b-eGFP und CD53s-eGFP transduzierten FaDu- und N-KM Zellen in den PE-Messbereich verschoben. Da Tetraspanine im allgemeinen in der Plasmamembran von Zellen lokalisiert sind (Rubinstein et al. 1996; Szollosi et al. 1996; Boucheix und Rubinstein 2001; Hemler 2005; Berditchevski und Odintsova 2007; Charrin et al. 2009), entsprachen diese Verschiebungen in den PE-Messbereich den Erwartungen: Nach Überexpression der Fusionsproteine sollten stärker eGFP-positive Zellen nach der AK-Färbung entsprechend stärker in den PE-positiven Bereich verschoben sein. CD37 befindet sich laut Literatur auf intrazellulären Vesikeln (Schwartz-Albiez et al. 1988). Aus diesem Grund wurde bei Ansätzen mit CD37a- bzw. CD37b-eGFP nicht erwartet, dass diese Fusionsproteine an der Oberfläche von Zellen detektiert werden können. Tatsächlich

waren gefärbte CD37a-eGFP transduzierte Zellen in den PE-Messbereich verschoben, so dass anzunehmen ist, dass das CD37a-eGFP Fusionsprotein nach dessen Überexpression in die Zellmembran eingebaut wird. Man konnte bei gefärbten CD9-, CD81- und CD151-eGFP transduzierten FaDu- und N-KM-Zellen, sowie bei CD82-eGFP transduzierten N-KM-Zellen zwei Hauptpopulationen von eGFP⁺ Zellen beobachten, die unterschiedlich stark in den PE-Messbereich verschoben waren. Mutmaßlich liegt in den Ansätzen mit zwei Hauptpopulationen eine Internalisierung der Tetraspanin-Fusionsproteine vor, wodurch die Epitope der Fusionsproteine bei einer extrazellulären Färbung maskiert und nur die nativ exprimierten Tetraspanine detektiert würden. In einigen Arbeiten wurden die Endozytose und Internalisierung von Tetraspaninen bereits beschrieben (Hammond et al. 1998; Xu et al. 2009; Farquhar et al. 2012). So besitzt CD82 C-Terminal ein *clathrin activating protein-2* Bindemotiv, das wahrscheinlich als Internalisierungssignal dient (Boll et al. 1996; Traub et al. 1996). CD53s-eGFP transduzierte Zellen waren nach der Antikörperfärbung gegen CD53 in FaDu- und N-KM-Zellen nicht in den PE-Messbereich verschoben. Die Immunzytochemischen Färbungen an CD53s-eGFP transduzierten Zellen wiesen kein Signal der anti-CD53 Färbung auf. Im Western-Blot konnte CD53s-eGFP ebenfalls nicht mit Antikörpern die gegen CD53 gerichtet waren nachgewiesen werden. Monoklonale Antikörper die an Tetraspanine binden sind in der Regel gegen ein Epitop innerhalb der großen extrazellulären Schleife gerichtet. Der CD53s Isoform fehlen innerhalb der großen extrazellulären Schleife 32 Aminosäuren, weshalb CD53s mutmaßlich nicht das immunogene Epitop ausbildet. Mit den bislang erhältlichen Antikörpern kann diese CD53 Isoform nicht detektiert werden. CD37b-eGFP transduzierte und entsprechend gefärbte FaDu- und N-KM-Zellen wiesen keine Verschiebung in den PE-Messbereich auf. Der CD37b Variante fehlt durch alternatives Spleißen ein Segment im 5'-Bereich der kodierenden Region des Gens. Dadurch hat diese Isoform im Vergleich zur Isoform A nach der Expression einen um 68 Aminosäuren verkürzten N-Terminus. Topologisch fehlen ihr der intrazelluläre N-terminale Anteil, die komplette erste extrazelluläre Schleife sowie die beiden ersten Transmembrandomänen. Die evolutiv hoch konservierten hydrophoben Transmembrandomänen sind wahrscheinlich für Wechselwirkungen zwischen Tetraspaninen untereinander von Bedeutung (Berditchevski 2001; Hemler 2001; Stipp et al. 2003). Mutmaßlich interagiert CD37b aufgrund der fehlenden zwei Transmembrandomänen nicht mehr mit anderen Tetraspaninen und ist subzellulär nicht

wie die Isoform CD37a lokalisiert. Diese Annahme wird durch die mikroskopischen Analysen der Verteilungsmuster von CD37b-eGFP bekräftigt. In diesen Ansätzen konnte man erkennen, dass das eGFP-Signal von CD37b-eGFP transduzierten Zellen diffus innerhalb der Zellen verteilt war.

Für den Nachweis der Fusionsproteine selbst und zur Überprüfung ihrer Integrität wurden proteinbiochemische Untersuchungen mittels Western-Blot-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden exemplarisch die Zelllysate transduzierter und nicht-manipulierter N-KM Zellen verwendet. Jedes Fusionsprotein, bis auf CD53s-eGFP, wurde nachgewiesen. Die Bande von CD63 ist auf den Western-Blot-Membranen als Schmier zu erkennen. CD63 wird posttranslational unterschiedlich stark glykosyliert, wodurch die Größe des Proteins in kDa variiert. Dieser Effekt wurde bereits in anderen Arbeiten beschrieben (Lee et al. 1990; Metzelaar et al. 1991; Engering et al. 2003). Die Banden von nativem CD81 laufen auf einer Höhe von etwa 24 kDa. In der Literatur wird CD81 mit einer Größe von 26 kDa angegeben (Andria et al. 1991; Levy et al. 1991). Diese Abweichung in der Größe von CD81 ist mutmaßlich auf ein unterschiedliches Laufverhalten der Proben und dem Proteinstandard während der gelelektrophoretischen Auftrennung zurückzuführen.

4.2.2 Subzelluläre Lokalisation von Tetraspanin-eGFP Fusionsproteinen

Nachdem die Tetraspanin-eGFP Expressionskassetten in N-KM-, FaDu- und THP1-Zellen stabil exprimiert wurden, waren klar definierbare Muster des eGFP-Signals zu erkennen. Diese ließen sich in zwei Kategorien einordnen. Hierbei waren die Signale von CD9-, CD53s-, CD53- und CD63-eGFP stark membranständig und vesikulär lokalisiert. CD37-, CD81-, CD82- und CD151-eGFP waren deutlich in Vesikelstrukturen vorzufinden. Diese subzellulären Lokalisationen gehen einher mit bisher veröffentlichten Arbeiten, die sich mit ähnlichen Fragestellungen befassen. So sind eGFP-CD9 Fusionsproteine nahezu identisch in der Membran von kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen und Melanozyten lokalisiert (Funakoshi et al. 2003; Garcia-Lopez et al. 2005). CD37 ist in humanen B-Zellen in intrazellulären Vesikeln lokalisiert (Schwartz-Albiez et al. 1988). Immunzytochemische Färbungen von CD53 in HSVZ wurden schon in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt und weisen deutlich vesikuläre Strukturen auf (Beckmann et al. 2007). Die vesikulären Lokalisationsmuster von CD63-eGFP sind identisch zu den in dieser Arbeit durchgeführten Färbungen in denen CD63 immunzytochemisch angefärbt wurde. CD81-eGFP ist sowohl in T-Zellen

als auch in Hepatozyten vesikulär lokalisiert (Mittelbrunn et al. 2002; Collier et al. 2009). In immunzytochemischen Färbungen an humanen lymphoblastoiden B-Zellen weist auch CD82 nahezu identische vesikuläre Muster auf (Hammond et al. 1998). CD82- und CD63-YFP und -CFP Fusionsproteine weisen nach ihrer Überexpression in HEK293T-Zellen vesikuläre Muster auf (Hoorn et al. 2012). Auch CD151-eGFP ist in epithelialen Podozyten deutlich vesikulär lokalisiert (Blumenthal et al. 2012).

In CD9-, CD81- und CD151- eGFP transduzierten Zellen waren mit steigender eGFP Intensität größere Vesikelstrukturen beobachtbar. CD9-eGFP transduzierte Zellen wiesen nur Vesikel auf, wenn das eGFP-Signal sehr stark war. Möglicherweise sind die Tetraspanine an der Biogenese dieser Vesikel beteiligt, so dass ihre starke Überexpression zu größeren Vesikeln führt. Dies könnte durch die Fusion mehrerer Vesikel passiert sein oder durch eine verstärkte Internalisierung der Tetraspanin-Fusionsproteine von der Zelloberfläche. Andererseits könnten diese Vesikel Lysosomen darstellen, in welche die stark exprimierten Fusionsproteine geleitet und degradiert werden.

Die beobachteten subzellulären Verteilungsmuster der Fusionsproteine waren gleichartig in transduzierten FaDu-, N-KM- und THP1-Zellen. Nach der durchflusszytometrischen Anreicherung der transduzierten Zellen, waren bei allen Ansätzen der FaDu-Zellen, und bei CD9- und CD63-eGFP transduzierten N-KM Zellen immer noch nicht-transduzierte Zellen vorhanden. Diese nicht-transduzierten Zellen treten als Subpopulationen in den durchflusszytometrischen Messungen, wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, wieder auf.

Im Besonderen soll an dieser Stelle auf einen potentiellen Effekt des eGFP-Fusionsanteils eingegangen werden. Ein Vorteil von fluoreszenten Proteinen ist, dass sie in der Lage sind interne Chromophore zu bilden, die keine zusätzlichen Kofaktoren, Enzyme oder Substrate für die Ausbildung der Fluoreszenz benötigen. Lediglich molekularer Sauerstoff und Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm sind nötig, damit eine Fluoreszenz entsteht. In der Regel ist ein GFP nicht toxisch (Tsien 1998; Shaner et al. 2005) und der Leseraster eines GFP lässt sich mit Hilfe von Klonierungsarbeiten relativ einfach an andere proteinkodierende Sequenzen anhängen. Aus diesen Gründen ist es möglich, die fluoreszenten Proteine zur Nachverfolgung von anderen Proteinen in lebenden Organismen, Geweben oder Zellen zu verwenden (Zacharias et al. 2000; Campbell et al. 2002; Labas et al. 2002). Das modifizierte eGFP hat dabei einige Vorteile gegenüber dem wildtypischen GFP der Qualle *Aequorea*

victoria. So sind durch einen Aminosäureaustausch (Phe64→Leu) die Faltungseigenschaften des Proteins in seine Tertiärstruktur bei 37°C verbessert worden. Ein weiterer Aminosäureaustausch (Ser65→Thr) führt dazu, dass eGFP 35-fach heller leuchtet als GFP (Heim et al. 1995; Cormack et al. 1996; Stepanenko et al. 2008). Zudem besitzt eGFP eine höhere Photostabilität als andere Fluoreszenzproteine (Shaner et al. 2005). Ein Nachteil des eGFP als Reporter von Fusionsproteinen ist seine schwache Eigenschaft Homodimere auszubilden (Jain et al. 2001; Verkhusha und Lukyanov 2004; Shaner et al. 2005). Dies ist im Hinblick auf Tetraspanine von besonderer Bedeutung, da diese in räumlicher Nähe zueinander stehen und selbst untereinander Homodimere ausbilden können. Des Weiteren wurde bereits ein Effekt auf die Funktion eines eGFP markierten Proteins beschrieben (Agbulut et al. 2006; Agbulut et al. 2007). In den Arbeiten wird gezeigt, dass eGFP die Bindung von Myosin und Aktin inhibiert, indem es an Myosin bindet. Ein ähnlicher Effekt könnte auch bei den großen Vesikeln in CD9-, CD81- und CD151-eGFP transduzierten Zellen vorliegen, so dass diese großen Vesikel aufgrund der starken eGFP-Präsenz entstanden sein könnten. Um diesen möglichen Einfluss auszuschließen, empfiehlt es sich monomeres eGFP bzw. ein monomeres Fluoreszenzprotein als Reporteranteil in Tetraspanin-Fusionsproteinen zu verwenden. Monomeres eGFP ist bereits beschrieben worden und konnte durch einen AS-Austausch (Ala206→Lys) generiert werden (Zacharias et al. 2002). Weiterhin sollten zur Überprüfung Tetraspanin-IRES-eGFP transduzierte Zellen mit Immunzytochemischen Färbungen gegen das jeweilige Tetraspanin untersucht werden. Treten hierbei die gleichen Muster auf, kann davon ausgegangen werden, dass das eGFP nicht die Musterverteilung von Tetraspanin-eGFP Fusionsproteinen beeinflusst.

4.2.3 Wechselbeziehung von Tetraspaninen und dem endosomalen System

Unsere Gruppe konnte zeigen, dass Tetraspanine in sich teilenden HSVZ asymmetrisch segregieren (Beckmann et al. 2007; Giebel und Beckmann 2007). Wie bereits erwähnt wurde eine Assoziation von Tetraspaninen und dem endosomalen System bereits beschrieben (Escola et al. 1998; Kobayashi et al. 2000; van Niel et al. 2011). Des Weiteren wurde in den Modellorganismen *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* ein Bezug zwischen Endozytose und dem Entwicklungsschicksal von Tochterzellen nachgewiesen (Bokel et al. 2006; Andrews und Ahringer 2007).

Aufgrund dieser Ergebnisse war es von Interesse inwieweit CD53 und CD63, sowie die Tetraspanine CD9, CD37a, CD37b, CD81, CD82 und CD151 mit dem endosomalen System im Zusammenhang stehen.

Um zu untersuchen, ob die Tetraspanin-Fusionsproteine mit dem endosomalen System in Zusammenhang stehen oder ob sie dieses beeinflussen, wurden FaDu-, N-KM- und THP1-Zellen stabil mit den Fusionskonstrukten transduziert. Mit Hilfe von immunzytochemischen Färbungen und mikroskopischen Analysen wurde der Bezug der Fusionsproteine zu endosomalen Kompartimenten untersucht. In den hier vorliegenden mikroskopischen Analysen wurde gezeigt, dass CD9-, CD53-, CD53s-, CD63-, CD81-, CD82 und CD151-eGFP Fusionsproteine in allen untersuchten Zellen mit Markern des späten endosmalen Kompartiments (Rab7 und CD63) kolokalisieren. CD37a-eGFP war N-KM- und THP1-Zellen mit dem frühen endosomalen Kompartiment assoziiert. In FaDu-Zellen war CD37a-eGFP sowohl mit dem frühen, als auch mit dem späten endosomalen Kompartiment lokalisiert. CD81-eGFP und CD151-eGFP wiesen in allen Zelllinien sowohl mit dem frühen, als auch mit dem späten endosomalen Kompartiment Kolokalisationen auf. Auch die großen atypischen Vesikel, die in CD81-, CD82- und CD151-eGFP transduzierten Zellen zu beobachten waren, wiesen ebenso diese beschriebenen Kolokalisationen auf.

Es ist möglich, dass die Tetraspanine bei der vorschreitenden Biogenese von späten Endosomen in entstehende *Multivesicular Bodies* MVBs sortiert werden, deren Inhalt als Exosomen in den Extrazellularraum abgegeben werden (Lakkaraju und Rodriguez-Boulau 2008). Vermutlich sind Tetraspanine an der Fusion von Exosomen und Zellmembranen involviert. Es wurde schon beschrieben, dass eine spezifische Zusammensetzung von Tetraspaninen und Integrinen in Exosomen einen Einfluss auf die Aufnahme bzw. Fusion von Exosomen und Zellen hat (Zoeller 2009; Rana und Zoller 2011; van den Boorn et al. 2013). Für weitere Analysen bezüglich bestimmter Zielsignale, die sich aus der Zusammensetzung von Tetraspaninen und ihrer Interaktionspartner ergeben, sollten Proteinprofile von Exosomen erstellt und verglichen werden. Hierbei ist es von besonderem Interesse, ob diese Profile in Exosomen von Tetraspanin-überexprimierenden Zellen verändert sind bzw. manipuliert werden können. Für weitere Analysen ist in diesem Zusammenhang auch ein RNAi vermittelter *Knock-Down* von Tetraspaninen in Zellen von Bedeutung.

Von besonderem Interesse sind die Kolokalisationen von CD81- und CD151-eGFP sowohl mit dem frühen, als auch mit dem späten endosomalen Kompartiment.

Möglicherweise bewirkt die Überexpression von CD81-eGFP und CD151-eGFP in den untersuchten Zellen eine verstärkte Fusion von Vesikeln des endosomalen Systems. Endosomen fusionieren und knospen von der Membran ab. Durch die Überexpression von CD81-eGFP und CD151-eGFP könnte die Kinetik dieses Vorgangs zu einer verstärkten Fusion hin verschoben sein. Dies sollte man weiter untersuchen, indem man diese Vesikel aufreinigt und proteinbiochemisch analysiert. Andererseits könnten diese Vesikel auch ein Zwischenstadium im Reifeprozess von frühen zu späten Endosomen darstellen.

Mutmaßlich sind Tetraspanine an der intrazellulären Biogenese von Endosomen bzw. endosomalen Kompartimenten beteiligt. Es wurde bereits beschrieben, dass CD63 in endosomalen, ESCRT-unabhängigen Sortierungsprozessen involviert ist, wobei die Bildung von intraluminalen Vesikeln in der Abwesenheit von CD63 deutlich vermindert war (van Niel et al. 2011). Des Weiteren ist es vorstellbar, dass Tetraspanine Rab-GTPasen in räumliche Nähe zueinander bringen, und auf diese Weise die Biogenese von endosomalen Kompartimenten fördern. Die Anhäufung von Tetraspaninen und verschiedener Interaktionspartner in Membran-Mikrodomänen wurde bereits beschrieben. Diese *tetraspanin enriched microdomains (TEM)* dienen dabei unter anderem der Signalverstärkung in Signaltransduktionsprozessen (Boucheix und Rubinstein 2001; Hemler 2001; Stipp et al. 2003; Levy und Shoham 2005; Yanez-Mo et al. 2009).

Die Morphologie des Zytoskeletts (Aktin und Tubulin) und der Zellmembran (CD81) wies in Tetraspanin-eGFP transduzierten Zellen keine Veränderungen im Vergleich zu den nicht-transduzierten Zellen auf. Entgegen dieser Beobachtung gibt es mehrere Arbeiten die beschreiben, dass Tetraspanine mit dem Zytoskelett und der Zellmembran interagieren und diese Kompartimente auch modulieren. So reguliert CD82 die Morphogenese von Mikrovilli und organisiert das Aktinskelett in Karzinomzellen aus der Prostata, leukämischen Monozyten und T-Zellen (Lagaudriere-Gesbert et al. 1998; Bari et al. 2011; Liu et al. 2012). Das Tetraspanin EWI-2 reguliert die Bildung des Aktinskeletts der immunologischen Synapse in T-Zellen (Gordon-Alonso et al. 2012).

Um mit Hilfe von Tetraspanin-Fusionsproteinen asymmetrische Zellteilungen von CD34⁺ Zellen beobachten zu können, wurde zunächst an FaDu-, N-KM- und THP1-Zellen analysiert, ob die aberante Expression der Fusionsproteine einen Einfluss auf Zelluläre Strukturen ausübt. Es stellte sich heraus, dass CD9-, CD81-, CD82- und

CD151-eGFP Fusionsproteine mit steigender eGFP-Intensität veränderte Lokalisationsmuster (atypische Vesikel) aufwiesen. CD37a-, CD81- und CD151-eGFP Fusionsproteine wiesen sowohl mit dem frühen, als auch mit dem späten endosomalen Kompartiment Koloalisationen auf. Diese Kompartimente sind normalerweise exklusiv vorzufinden. CD9-eGFP Fusionsproteine sind überwiegend membranständig lokalisiert.

In den durchflusszytometrischen Analysen transduzierter CD34⁺ Zellen, wiesen die Ansätze mit den Tetraspaninen, bis auf CD53 und CD53s, keine Veränderungen bezüglich der Dynamik der beobachteten Populationen auf. Die CD53- und CD53s Ansätze wiesen eine höhere Mortalitätsrate von transduzierten, als auch nicht-transduzierten Zellen auf. Aufgrund dieser Ergebnisse eignen sich CD63-eGFP Fusionsproteine am besten um asymmetrische Zellteilungen in CD34⁺ Zellen mikroskopisch zu beobachten und möglicherweise primitive von reiferen Zellen zu trennen. Aus Zeitgründen wurde dieser Versuch nicht mehr durchgeführt. Inzwischen wurde ein neuer CD133-Antikörper identifiziert, der keinen Einfluss auf die Zellbiologie von CD34⁺ Zellen ausübt. Analysen zur asymmetrischen Zellteilung können ebenso mit diesem Antikörper durchgeführt werden, ohne dass die Zellen dafür genetisch manipuliert werden müssen.

5 Zusammenfassung

Hämatopoetische Stammzellen (HSZ) besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und sind in der Lage, Vorläuferzellen hervorzubringen, die in spezialisierte Zellen differenzieren können. Die Mechanismen, welche die Selbsterneuerung *versus* Differenzierung steuern, sind bis heute weitgehend unbekannt.

Mit dem Ziel, neue Gene zu identifizieren, deren Genprodukte an den Prozessen der Selbsterneuerung und Differenzierung von primitiven humanen Hämatopoetischen Stammzellen beteiligt sind, wurden im Vorfeld dieser Arbeit Genexpressionsanalysen von unterschiedlichen hämatopoetischen Zellpopulationen angefertigt. Es konnten Gene identifiziert werden, die spezifisch in primitiven hämatopoetischen Zellfraktionen exprimiert werden. In dieser Arbeit wurde der Einfluss ausgewählter Gene auf die Dynamik von CD34⁺ und CD133⁺ Populationen in HSZ untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Kandidatengene in lentivirale Plasmide kloniert und stabil in frisch isolierten CD34⁺ Zellen überexprimiert. Im weiteren Verlauf wurden die Anteile der CD34⁺ und CD133⁺ Populationen durchflusszytometrisch über 14 Tage dokumentiert. Es konnten 8 Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die nach ihrer Überexpression die Populationskinetik im Vergleich zu den Kontrollen veränderten. Hierzu gehören die Gene *BHLHB2*, *CEBPD*, *KLF4*, *SNAI2*, *SOX2*, *SOX9*, *SOX11* und *ZNF281*.

Zellschicksalsanalysen von Nachkommen einzelner primitiver HSZ deuten darauf hin, dass die Entscheidung der Selbsterneuerung *versus* Differenzierung möglicherweise durch asymmetrische Zellteilungen reguliert wird. Es wurden bislang vier Proteine identifiziert, die in ca. 20% sich teilender humaner HSZ asymmetrisch segregieren. Zwei dieser Proteine, CD53 und CD63, gehören zur Familie der Tetraspanine. In dieser Arbeit wurde nach Möglichkeiten gesucht, solche asymmetrischen Zellteilungen in lebenden Zellen verfolgen zu können. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine generiert und durchflusszytometrisch, proteinbiochemisch sowie immunzytochemisch validiert. Es stellte sich heraus, dass CD63-eGFP Fusionsproteine sich am besten zur optischen Nachverfolgung asymmetrischer Zellteilungen von CD34⁺ Zellen eignen. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Überexpression von CD9-, CD81-, CD82- und CD151-eGFP Fusionsproteinen zur Bildung von atypischen Vesikeln führte. CD37a-, CD81- und CD151-eGFP Fusionsproteine kolokalisierten sowohl mit dem frühen, als auch mit dem späten endosomalen Kompartiment.

6 Literaturverzeichnis

1. Abramovich, C. and R. K. Humphries (2005). "Hox regulation of normal and leukemic hematopoietic stem cells." Curr. Opin. Hematol. **12**(3): 210-216.
2. Abramovich, C., N. Pineault, H. Ohta and R. K. Humphries (2005). "Hox genes: from leukemia to hematopoietic stem cell expansion." Ann. N. Y. Acad. Sci. **1044**: 109-116.
3. Abrink, M., A. E. Gobl, R. Huang, K. Nilsson and L. Hellman (1994). "Human cell lines U-937, THP-1 and Mono Mac 6 represent relatively immature cells of the monocyte-macrophage cell lineage." Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K **8**(9): 1579-1584.
4. Agbulut, O., C. Coirault, N. Niederlander, A. Huet, P. Vicart, A. Hagege, M. Puceat and P. Menasche (2006). "GFP expression in muscle cells impairs actin-myosin interactions: implications for cell therapy." Nat Methods **3**(5): 331.
5. Agbulut, O., A. Huet, N. Niederlander, M. Puceat, P. Menasche and C. Coirault (2007). "Green fluorescent protein impairs actin-myosin interactions by binding to the actin-binding site of myosin." J. Biol. Chem. **282**(14): 10465-71.
6. Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto and I. L. Weissman (2000). "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." Nature **404**(6774): 193-197.
7. Akutsu, H., T. Miura, M. Machida, J. Birumachi, A. Hamada, M. Yamada, S. Sullivan, K. Miyado and A. Umezawa (2009). "Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of tetraspanin CD9." Differentiation **78**(2-3): 137-42.
8. Andrews, R. and J. Ahringer (2007). "Asymmetry of early endosome distribution in *C. elegans* embryos." PLoS One **2**(6): e493.
9. Andria, M. L., C. L. Hsieh, R. Oren, U. Francke and S. Levy (1991). "Genomic organization and chromosomal localization of the TAPA-1 gene." J. Immunol. **147**(3): 1030-6.
10. Angelisova, P., I. Hilgert and V. Horejsi (1994). "Association of four antigens of the tetraspans family (CD37, CD53, TAPA-1, and R2/C33) with MHC class II glycoproteins." Immunogenetics **39**(4): 249-56.
11. Antonchuk, J., G. Sauvageau and R. K. Humphries (2001). "HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation." Exp. Hematol. **29**(9): 1125-34.
12. Antonchuk, J., G. Sauvageau and R. K. Humphries (2002). "HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo." Cell **109**(1): 39-45.
13. Arduise, C., T. Abache, L. Li, M. Billard, A. Chabanon, A. Ludwig, P. Mauduit, C. Boucheix, E. Rubinstein and F. Le Naour (2008). "Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor." J. Immunol. **181**(10): 7002-13.
14. Arribas, M. and D. F. Cutler (2000). "Weibel-Palade body membrane proteins exhibit differential trafficking after exocytosis in endothelial cells." Traffic **1**(10): 783-93.
15. Azorsa, D. O., J. A. Hyman and J. E. Hildreth (1991). "CD63/Pltgp40: a platelet activation antigen identical to the stage-specific, melanoma-associated antigen ME491." Blood **78**(2): 280-4.

16. Baltimore, D. (1970). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses." Nature **226**(5252): 1209-11.
17. Barbaro, V., A. Testa, E. Di Iorio, F. Mavilio, G. Pellegrini and M. De Luca (2007). "C/EBPdelta regulates cell cycle and self-renewal of human limbal stem cells." J. Cell Biol. **177**(6): 1037-49.
18. Barbero, P., L. Bittova and S. R. Pfeffer (2002). "Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells." J. Cell Biol. **156**(3): 511-8.
19. Bari, R., Q. Guo, B. Xia, Y. H. Zhang, E. E. Giesert, S. Levy, J. J. Zheng and X. A. Zhang (2011). "Tetraspanins regulate the protrusive activities of cell membrane." Biochem. Biophys. Res. Commun. **415**(4): 619-26.
20. Barrallo-Gimeno, A. and M. A. Nieto (2005). "The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer." Development **132**(14): 3151-61.
21. Beckmann, J., S. Scheitza, P. Wernet, J. C. Fischer and B. Giebel (2007). "Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins." Blood **109**(12): 5494-5501.
22. Beckmann, J., S. Scheitza, P. Wernet, J. C. Fischer and B. Giebel (2007). "Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins." Blood **109**(12): 5494-501.
23. Begley, C. G. and A. R. Green (1999). "The SCL gene: from case report to critical hematopoietic regulator." Blood **93**(9): 2760-70.
24. Behr, R., C. Heneweer, C. Viebahn, H. W. Denker and M. Thie (2005). "Epithelial-mesenchymal transition in colonies of rhesus monkey embryonic stem cells: a model for processes involved in gastrulation." Stem Cells **23**(6): 805-16.
25. Beinert, T., S. Munzing, K. Possinger and F. Krombach (2000). "Increased expression of the tetraspanins CD53 and CD63 on apoptotic human neutrophils." J. Leukocyte Biol. **67**(3): 369-73.
26. Berditchevski, F. (2001). "Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye." J. Cell Sci. **114**(Pt 23): 4143-51.
27. Berditchevski, F., G. Bazzoni and M. E. Hemler (1995). "Specific association of CD63 with the VLA-3 and VLA-6 integrins." J. Biol. Chem. **270**(30): 17784-90.
28. Berditchevski, F., E. Gilbert, M. R. Griffiths, S. Fitter, L. Ashman and S. J. Jenner (2001). "Analysis of the CD151-alpha3beta1 integrin and CD151-tetraspanin interactions by mutagenesis." J. Biol. Chem. **276**(44): 41165-74.
29. Berditchevski, F. and E. Odintsova (2007). "Tetraspanins as regulators of protein trafficking." Traffic (Copenhagen, Denmark) **8**(2): 89-96.
30. Berditchevski, F., M. M. Zutter and M. E. Hemler (1996). "Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins)." Mol. Biol. Cell **7**(2): 193-207.
31. Bergsland, M., M. Werme, M. Malewicz, T. Perlmann and J. Muhr (2006). "The establishment of neuronal properties is controlled by Sox4 and Sox11." Genes Dev. **20**(24): 3475-86.
32. Betschinger, J., K. Mechtler and J. A. Knoblich (2006). "Asymmetric segregation of the tumor suppressor brat regulates self-renewal in Drosophila neural stem cells." Cell **124**(6): 1241-1253.

33. Betschinger, J. r. and J. r. A. Knoblich (2004). "Dare to be different: asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates." Current Biology: CB **14**(16): R674-685-R674-685.
34. Betschinger, J. r., K. Mechtler and J. A. Knoblich (2003). "The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl." Nature **422**(6929): 326-330.
35. Bhatia, M., D. Bonnet, D. Wu, B. Murdoch, J. Wrana, L. Gallacher and J. E. Dick (1999). "Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells." The Journal of Experimental Medicine **189**(7): 1139-48.
36. Bhatia, M., J. C. Wang, U. Kapp, D. Bonnet and J. E. Dick (1997). "Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **94**(10): 5320-5.
37. Blumenthal, A., J. Giebel, R. Ummanni, R. Schluter, K. Endlich and N. Endlich (2012). "Morphology and migration of podocytes are affected by CD151 levels." Am J Physiol Renal Physiol **302**(10): F1265-77.
38. Bokel, C., A. Schwabedissen, E. Entchev, O. Renaud and M. Gonzalez-Gaitan (2006). "Sara endosomes and the maintenance of Dpp signaling levels across mitosis." Science **314**(5802): 1135-9.
39. Boll, W., H. Ohno, Z. Songyang, I. Rapoport, L. C. Cantley, J. S. Bonifacino and T. Kirchhausen (1996). "Sequence requirements for the recognition of tyrosine-based endocytic signals by clathrin AP-2 complexes." EMBO J. **15**(21): 5789-95.
40. Boucheix, C. and E. Rubinstein (2001). "Tetraspanins." Cell. Mol. Life Sci. **58**(9): 1189-205.
41. Boudjelal, M., R. Taneja, S. Matsubara, P. Bouillet, P. Dolle and P. Chambon (1997). "Overexpression of Stra13, a novel retinoic acid-inducible gene of the basic helix-loop-helix family, inhibits mesodermal and promotes neuronal differentiation of P19 cells." Genes Dev. **11**(16): 2052-65.
42. Boussif, O., F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix and J. P. Behr (1995). "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **92**(16): 7297-301.
43. Bracker, T. U., B. Giebel, J. Spanholtz, U. R. Sorg, L. Klein-Hitpass, T. Moritz and J. r. Thomale (2006). "Stringent regulation of DNA repair during human hematopoietic differentiation: a gene expression and functional analysis." Stem Cells (Dayton, Ohio) **24**(3): 722-730.
44. Brennan, D. J., S. Ek, E. Doyle, T. Drew, M. Foley, G. Flannelly, D. P. O'Connor, W. M. Gallagher, S. Kilpinen, O. P. Kallioniemi, K. Jirstrom, C. O'Herlihy and C. A. Borrebaeck (2009). "The transcription factor Sox11 is a prognostic factor for improved recurrence-free survival in epithelial ovarian cancer." Eur. J. Cancer **45**(8): 1510-7.
45. Brummendorf, T. H., W. Dragowska, J. Zijlmans, G. Thornbury and P. M. Lansdorp (1998). "Asymmetric cell divisions sustain long-term hematopoiesis from single-sorted human fetal liver cells." J. Exp. Med. **188**(6): 1117-24.
46. Burchert, A., M. Notter, H. Dietrich Menssen, S. Schwartz, W. Knauf, A. Neubauer and E. Thiel (1999). "CD82 (KAI1), a member of the tetraspan family, is expressed on early haemopoietic progenitor cells and up-regulated in distinct human leukaemias." Br. J. Haematol. **107**(3): 494-504.
47. Calvi, L. M., G. B. Adams, K. W. Weibrecht, J. M. Weber, D. P. Olson, M. C. Knight, R. P. Martin, E. Schipani, P. Divieti, F. R. Bringhurst, L. A. Milner, H.

- M. Kronenberg and D. T. Scadden (2003). "Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche." *Nature* **425**(6960): 841-846.
48. Campbell, R. E., O. Tour, A. E. Palmer, P. A. Steinbach, G. S. Baird, D. A. Zacharias and R. Y. Tsien (2002). "A monomeric red fluorescent protein." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**(12): 7877-82.
 49. Charrin, S., F. Le Naour, M. Oualid, M. Billard, G. Faure, S. M. Hanash, C. Boucheix and E. Rubinstein (2001). "The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes." *J. Biol. Chem.* **276**(17): 14329-37.
 50. Charrin, S., F. le Naour, O. Silvie, P. E. Milhiet, C. Boucheix and E. Rubinstein (2009). "Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web." *Biochem. J.* **420**(2): 133-54.
 51. Chen, M. S., K. S. Tung, S. A. Coonrod, Y. Takahashi, D. Bigler, A. Chang, Y. Yamashita, P. W. Kincade, J. C. Herr and J. M. White (1999). "Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**(21): 11830-5.
 52. Chen, X., E. M. Whitney, S. Y. Gao and V. W. Yang (2003). "Transcriptional profiling of Kruppel-like factor 4 reveals a function in cell cycle regulation and epithelial differentiation." *J. Mol. Biol.* **326**(3): 665-77.
 53. Chinnasamy, D., M. D. Milsom, J. Shaffer, J. Neuenfeldt, A. F. Shaaban, G. P. Margison, L. J. Fairbairn and N. Chinnasamy (2006). "Multicistronic lentiviral vectors containing the FMDV 2A cleavage factor demonstrate robust expression of encoded genes at limiting MOI." *Virology* **3**: 14.
 54. Civin, C. I., L. C. Strauss, C. Brovall, M. J. Fackler, J. F. Schwartz and J. H. Shaper (1984). "Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells." *J. Immunol.* **133**(1): 157-65.
 55. Classon, B. J., A. F. Williams, A. C. Willis, B. Seed and I. Stamenkovic (1990). "The primary structure of the human leukocyte antigen CD37, a species homologue of the rat MRC OX-44 antigen." *J. Exp. Med.* **172**(3): 1007.
 56. Clevers, H. (2011). "The cancer stem cell: premises, promises and challenges." *Nat. Med.* **17**(3): 313-9.
 57. Cnops, G., P. Neyt, J. Raes, M. Petrarulo, H. Nelissen, N. Malenica, C. Luschnig, O. Tietz, F. Ditengou, K. Palme, A. Azmi, E. Prinsen and M. Van Lijsebettens (2006). "The TORNADO1 and TORNADO2 genes function in several patterning processes during early leaf development in Arabidopsis thaliana." *Plant Cell* **18**(4): 852-66.
 58. Collier, K. E., K. L. Berger, N. S. Heaton, J. D. Cooper, R. Yoon and G. Randall (2009). "RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis." *PLoS Pathog* **5**(12): e1000702.
 59. Corbeil, D., K. Roper, A. Weigmann and W. B. Huttner (1998). "AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family?" *Blood* **91**(7): 2625-6.
 60. Cormack, B. P., R. H. Valdivia and S. Falkow (1996). "FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)." *Gene* **173**(1 Spec No): 33-8.
 61. Cosset, F. L., Y. Takeuchi, J. L. Battini, R. A. Weiss and M. K. Collins (1995). "High-titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum." *J. Virol.* **69**(12): 7430-6.
 62. Crosland-Taylor, P. J. (1953). "A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube." *Nature* **171**(4340): 37-8.

63. Davies, M. V. and R. J. Kaufman (1992). "The sequence context of the initiation codon in the encephalomyocarditis virus leader modulates efficiency of internal translation initiation." *J. Virol.* **66**(4): 1924-32.
64. De Santa Barbara, P., N. Bonneaud, B. Boizet, M. Desclozeaux, B. Moniot, P. Sudbeck, G. Scherer, F. Poulat and P. Berta (1998). "Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene." *Mol. Cell. Biol.* **18**(11): 6653-65.
65. de Wynter, E. A., D. Buck, C. Hart, R. Heywood, L. H. Coutinho, A. Clayton, J. A. Rafferty, D. Burt, G. Guenechea, J. A. Bueren, D. Gagen, L. J. Fairbairn, B. I. Lord and N. G. Testa (1998). "CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors." *Stem Cells* **16**(6): 387-96.
66. Denecke, B., L. D. Horsch, S. Radtke, J. C. Fischer, P. A. Horn and B. Giebel (2013). "Human endothelial colony-forming cells expanded with an improved protocol are a useful endothelial cell source for scaffold-based tissue engineering." *J Tissue Eng Regen Med.*
67. Dick, J. E., M. Bhatia, O. Gan, U. Kapp and J. C. Wang (1997). "Assay of human stem cells by repopulation of NOD/SCID mice." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* **15 Suppl 1**: 199-203; discussion 204-7-199-203; discussion 204-7.
68. Dirks, W., M. Wirth and H. Hauser (1993). "Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells." *Gene* **128**(2): 247-9.
69. Don, R. H., P. T. Cox, B. J. Wainwright, K. Baker and J. S. Mattick (1991). "'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification." *Nucleic Acids Res* **19**(14): 4008.
70. DuBridge, R. B., P. Tang, H. C. Hsia, P. M. Leong, J. H. Miller and M. P. Calos (1987). "Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system." *Mol. Cell. Biol.* **7**(1): 379-87.
71. Dunn, C. D., M. L. Sulis, A. A. Ferrando and I. Greenwald (2010). "A conserved tetraspanin subfamily promotes Notch signaling in *Caenorhabditis elegans* and in human cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
72. Engering, A., L. Kuhn, D. Fluitsma, E. Hoefsmit and J. Pieters (2003). "Differential post-translational modification of CD63 molecules during maturation of human dendritic cells." *Eur. J. Biochem.* **270**(11): 2412-20.
73. Escola, J. M., M. J. Kleijmeer, W. Stoorvogel, J. M. Griffith, O. Yoshie and H. J. Geuze (1998). "Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes." *J. Biol. Chem.* **273**(32): 20121-7.
74. Farquhar, M. J., K. Hu, H. J. Harris, C. Davis, C. L. Brimacombe, S. J. Fletcher, T. F. Baumert, J. Z. Rappoport, P. Balfe and J. A. McKeating (2012). "Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis." *J. Virol.* **86**(8): 4305-16.
75. Foster, J. W., M. A. Dominguez-Steglich, S. Guioli, C. Kwok, P. A. Weller, M. Stevanovic, J. Weissenbach, S. Mansour, I. D. Young, P. N. Goodfellow and et al. (1994). "Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene." *Nature* **372**(6506): 525-30.
76. Fradkin, L. G., J. T. Kamphorst, A. DiAntonio, C. S. Goodman and J. N. Noordermeer (2002). "Genomewide analysis of the *Drosophila* tetraspanins reveals a subset with similar function in the formation of the embryonic synapse." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**(21): 13663-8.
77. Funakoshi, T., I. Tachibana, Y. Hoshida, H. Kimura, Y. Takeda, T. Kijima, K. Nishino, H. Goto, T. Yoneda, T. Kumagai, T. Osaki, S. Hayashi, K. Aozasa and I. Kawase (2003). "Expression of tetraspanins in human lung cancer cells:

- frequent downregulation of CD9 and its contribution to cell motility in small cell lung cancer." *Oncogene* **22**(5): 674-87.
78. Furler, S., J. C. Paterna, M. Weibel and H. Bueler (2001). "Recombinant AAV vectors containing the foot and mouth disease virus 2A sequence confer efficient bicistronic gene expression in cultured cells and rat substantia nigra neurons." *Gene Ther.* **8**(11): 864-73.
 79. Gallacher, L., B. Murdoch, D. M. Wu, F. N. Karanu, M. Keeney and M. Bhatia (2000). "Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7." *Blood* **95**(9): 2813-2820.
 80. Garcia-Espana, A., P. J. Chung, I. N. Sarkar, E. Stiner, T. T. Sun and R. Desalle (2008). "Appearance of new tetraspanin genes during vertebrate evolution." *Genomics* **91**(4): 326-34.
 81. Garcia-Lopez, M. A., O. Barreiro, A. Garcia-Diez, F. Sanchez-Madrid and P. F. Penas (2005). "Role of tetraspanins CD9 and CD151 in primary melanocyte motility." *J. Invest. Dermatol.* **125**(5): 1001-9.
 82. Gehring, W. J., U. Kloter and H. Suga (2009). "Evolution of the Hox gene complex from an evolutionary ground state." *Curr. Top. Dev. Biol.* **88**: 35-61.
 83. Gerin, P. A., P. F. Searle and M. Al-Rubeai (1999). "Production of retroviral vectors for gene therapy with the human packaging cell line FLYRD18." *Biotechnol. Prog.* **15**(5): 941-8.
 84. Ghaleb, A. M., M. O. Nandan, S. Chanchevalap, W. B. Dalton, I. M. Hisamuddin and V. W. Yang (2005). "Kruppel-like factors 4 and 5: the yin and yang regulators of cellular proliferation." *Cell Res.* **15**(2): 92-6.
 85. Giebel, B. and J. Beckmann (2007). "Asymmetric cell divisions of human hematopoietic stem and progenitor cells meet endosomes." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* **6**(18): 2201-2204.
 86. Giebel, B., D. Corbeil, J. Beckmann, J. Hahn, D. Freund, K. Giesen, J. Fischer, G. Kögler and P. Wernet (2004). "Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells." *Blood* **104**(8): 2332-2338.
 87. Giebel, B. and M. Punzel (2008). "Lineage development of hematopoietic stem and progenitor cells." *Biol. Chem.* **389**(7): 813-824.
 88. Giebel, B., T. Zhang, J. Beckmann, J. Spanholtz, P. Wernet, A. D. Ho and M. Punzel (2006). "Primitive human hematopoietic cells give rise to differentially specified daughter cells upon their initial cell division." *Blood* **107**(5): 2146-52.
 89. Gordon-Alonso, M., M. Sala-Valdes, V. Rocha-Perugini, D. Perez-Hernandez, S. Lopez-Martin, A. Ursa, S. Alvarez, T. V. Kolesnikova, J. Vazquez, F. Sanchez-Madrid and M. Yanez-Mo (2012). "EWI-2 association with alpha-actinin regulates T cell immune synapses and HIV viral infection." *J. Immunol.* **189**(2): 689-700.
 90. Görgens, A., J. Beckmann, A. K. Ludwig, M. Mollmann, J. Durig, P. A. Horn, L. Rajendran and B. Giebel (2012). "Lipid raft redistribution and morphological cell polarization are separable processes providing a basis for hematopoietic stem and progenitor cell migration." *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**(7): 1121-32.
 91. Görgens, A., S. Radtke, M. Möllmann, M. Cross, J. Dürig, Peter A. Horn and B. Giebel (2013). "Revision of the Human Hematopoietic Tree: Granulocyte Subtypes Derive from Distinct Hematopoietic Lineages." *Cell Reports*.
 92. Gottgens, B., A. Nastos, S. Kinston, S. Piltz, E. C. Delabesse, M. Stanley, M. J. Sanchez, A. Ciau-Uitz, R. Patient and A. R. Green (2002). "Establishing the transcriptional programme for blood: the SCL stem cell enhancer is regulated by

- a multiprotein complex containing Ets and GATA factors." EMBO J. **21**(12): 3039-50.
93. Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J. Gen. Virol. **36**(1): 59-74.
 94. Grant, B. D. and J. G. Donaldson (2009). "Pathways and mechanisms of endocytic recycling." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(9): 597-608.
 95. Greaves, M. and C. C. Maley (2012). "Clonal evolution in cancer." Nature **481**(7381): 306-13.
 96. Grigoriou, M., M. C. Kastrinaki, W. S. Modi, K. Theodorakis, B. Mankoo, V. Pachnis and D. Karagogeos (1995). "Isolation of the human MOX2 homeobox gene and localization to chromosome 7p22.1-p21.3." Genomics **26**(3): 550-5.
 97. Guo, W., Z. Keckesova, J. L. Donaher, T. Shibue, V. Tischler, F. Reinhardt, S. Itzkovitz, A. Noske, U. Zurrer-Hardi, G. Bell, W. L. Tam, S. A. Mani, A. van Oudenaarden and R. A. Weinberg (2012). "Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state." Cell **148**(5): 1015-28.
 98. Gustavsson, E., S. Sernbo, E. Andersson, D. J. Brennan, M. Dictor, M. Jerkeman, C. A. Borrebaeck and S. Ek (2010). "SOX11 expression correlates to promoter methylation and regulates tumor growth in hematopoietic malignancies." Mol Cancer **9**: 187.
 99. Hammond, C., L. K. Denzin, M. Pan, J. M. Griffith, H. J. Geuze and P. Cresswell (1998). "The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **161**(7): 3282-3291.
 100. Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J. Mol. Biol. **166**(4): 557-80.
 101. Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-74.
 102. Heim, R., A. B. Cubitt and R. Y. Tsien (1995). "Improved green fluorescence." Nature **373**(6516): 663-4.
 103. Heinkelein, M., M. Schmidt, N. Fischer, A. Moebes, D. Lindemann, J. Enssle and A. Rethwilm (1998). "Characterization of a cis-acting sequence in the Pol region required to transfer human foamy virus vectors." J. Virol. **72**(8): 6307-14.
 104. Hemavathy, K., S. C. Guru, J. Harris, J. D. Chen and Y. T. Ip (2000). "Human Slug is a repressor that localizes to sites of active transcription." Mol. Cell. Biol. **20**(14): 5087-95.
 105. Hemler, M. E. (2001). "Specific tetraspanin functions." The Journal of Cell Biology **155**(7): 1103-1107.
 106. Hemler, M. E. (2003). "Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain." Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. **19**: 397-422.
 107. Hemler, M. E. (2005). "Tetraspanin functions and associated microdomains." Nature Reviews. Molecular Cell Biology **6**(10): 801-811.
 108. Hennecke, M., M. Kwissa, K. Metzger, A. Oumard, A. Kroger, R. Schirmbeck, J. Reimann and H. Hauser (2001). "Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs." Nucleic Acids Res **29**(16): 3327-34.
 109. Hide, T., T. Takezaki, Y. Nakatani, H. Nakamura, J. Kuratsu and T. Kondo (2009). "Sox11 prevents tumorigenesis of glioma-initiating cells by inducing neuronal differentiation." Cancer Res. **69**(20): 7953-9.

110. Hoegg, S. and A. Meyer (2005). "Hox clusters as models for vertebrate genome evolution." Trends in Genetics: TIG **21**(8): 421-424.
111. Holter, W., A. B. Rabson, C. D. Corsico and B. H. Howard (1991). "Sequence-specific toxicity of transfected retroviral DNA." Exp. Cell Res. **193**(1): 54-8.
112. Hoorn, T., P. Paul, L. Janssen, H. Janssen and J. Neefjes (2012). "Dynamics within tetraspanin pairs affect MHC class II expression." J. Cell Sci. **125**(Pt 2): 328-39.
113. Hopman, A. H., S. Claessen and E. J. Speel (1997). "Multi-colour brightfield in situ hybridisation on tissue sections." Histochem. Cell Biol. **108**(4-5): 291-8.
114. Hotta, H., A. H. Ross, K. Huebner, M. Isobe, S. Wendeborn, M. V. Chao, R. P. Ricciardi, Y. Tsujimoto, C. M. Croce and H. Koprowski (1988). "Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression." Cancer Res. **48**(11): 2955-62.
115. Huang, S., S. Yuan, M. Dong, J. Su, C. Yu, Y. Shen, X. Xie, Y. Yu, X. Yu, S. Chen, S. Zhang, P. Pontarotti and A. Xu (2005). "The phylogenetic analysis of tetraspanins projects the evolution of cell-cell interactions from unicellular to multicellular organisms." Genomics **86**(6): 674-84.
116. Ichikawa, M., T. Asai, S. Chiba, M. Kurokawa and S. Ogawa (2004). "Runx1/AML-1 ranks as a master regulator of adult hematopoiesis." Cell Cycle (Georgetown, Tex.) **3**(6): 722-4.
117. Ishii, Y., T. Kasukabe and Y. Honma (2005). "Induction of CCAAT/enhancer binding protein-delta by cytokinins, but not by retinoic acid, during granulocytic differentiation of human myeloid leukaemia cells." Br. J. Haematol. **128**(4): 540-7.
118. Ito, C. Y., D. C. Kirouac, G. J. Madlambayan, M. Yu, I. Rogers and P. W. Zandstra (2010). "The AC133+CD38-, but not the rhodamine-low, phenotype tracks LTC-IC and SRC function in human cord blood ex vivo expansion cultures." Blood **115**(2): 257-260.
119. Jain, R. K., P. B. Joyce, M. Molinete, P. A. Halban and S. U. Gorr (2001). "Oligomerization of green fluorescent protein in the secretory pathway of endocrine cells." Biochem. J. **360**(Pt 3): 645-9.
120. Jang, S. K., H. G. Krausslich, M. J. Nicklin, G. M. Duke, A. C. Palmenberg and E. Wimmer (1988). "A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation." J. Virol. **62**(8): 2636-43.
121. Janknecht, R. (2005). "EWS-ETS oncoproteins: the linchpins of Ewing tumors." Gene **363**: 1-14.
122. Jegou, A., A. Ziyat, V. Barraud-Lange, E. Perez, J. P. Wolf, F. Pincet and C. Gourier (2011). "CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for mammalian fertilization." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **108**(27): 10946-51.
123. Karin, M. (1990). "Too many transcription factors: positive and negative interactions." New Biol. **2**(2): 126-31.
124. Keeshan, K., G. Santilli, F. Corradini, D. Perrotti and B. Calabretta (2003). "Transcription activation function of C/EBPalpha is required for induction of granulocytic differentiation." Blood **102**(4): 1267-75.
125. Kiel, M. J., O. H. Yilmaz, T. Iwashita, O. H. Yilmaz, C. Terhorst and S. J. Morrison (2005). "SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells." Cell **121**(7): 1109-1121.

126. Kim, J. B., H. Zaehres, G. Wu, L. Gentile, K. Ko, V. Sebastiano, M. J. Arauzo-Bravo, D. Ruau, D. W. Han, M. Zenke and H. R. Scholer (2008). "Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors." *Nature* **454**(7204): 646-50.
127. Klump, H., B. Schiedlmeier and C. Baum (2005). "Control of self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells: HOXB4 on the threshold." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1044**: 6-15.
128. Kobayashi, T., U. M. Vischer, C. Rosnoblet, C. Lebrand, M. Lindsay, R. G. Parton, E. K. Kruithof and J. Gruenberg (2000). "The tetraspanin CD63/lamp3 cycles between endocytic and secretory compartments in human endothelial cells." *Mol. Biol. Cell* **11**(5): 1829-43.
129. Kondo, M., I. L. Weissman and K. Akashi (1997). "Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow." *Cell* **91**(5): 661-672.
130. Koury, M. J. and P. Ponka (2004). "New insights into erythropoiesis: the roles of folate, vitamin B12, and iron." *Annu. Rev. Nutr.* **24**: 105-31.
131. Kozak, M. (1984). "Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo." *Nature* **308**(5956): 241-6.
132. Kozak, M. (1984). "Selection of initiation sites by eucaryotic ribosomes: effect of inserting AUG triplets upstream from the coding sequence for preproinsulin." *Nucleic Acids Res* **12**(9): 3873-93.
133. Kozak, M. (1987). "At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells." *J. Mol. Biol.* **196**(4): 947-50.
134. Krause, D. S., M. J. Fackler, C. I. Civin and W. S. May (1996). "CD34: structure, biology, and clinical utility." *Blood* **87**(1): 1-13.
135. Kubo, H., M. Shimizu, Y. Taya, T. Kawamoto, M. Michida, E. Kaneko, A. Igarashi, M. Nishimura, K. Segoshi, Y. Shimazu, K. Tsuji, T. Aoba and Y. Kato (2009). "Identification of mesenchymal stem cell (MSC)-transcription factors by microarray and knockdown analyses, and signature molecule-marked MSC in bone marrow by immunohistochemistry." *Genes Cells* **14**(3): 407-24.
136. Kuijpers, T. W., A. T. Tool, C. E. van der Schoot, L. A. Ginsel, J. J. Onderwater, D. Roos and A. J. Verhoeven (1991). "Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation." *Blood* **78**(4): 1105-11.
137. Kuraku, S. and A. Meyer (2009). "The evolution and maintenance of Hox gene clusters in vertebrates and the teleost-specific genome duplication." *The International Journal of Developmental Biology* **53**(5-6): 765-773.
138. Kwok, C., P. A. Weller, S. Guioli, J. W. Foster, S. Mansour, O. Zuffardi, H. H. Punnett, M. A. Dominguez-Steglich, J. D. Brook, I. D. Young and et al. (1995). "Mutations in SOX9, the gene responsible for Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal." *Am. J. Hum. Genet.* **57**(5): 1028-36.
139. Kyba, M., R. C. Perlingeiro and G. Q. Daley (2002). "HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors." *Cell* **109**(1): 29-37.
140. Labas, Y. A., N. G. Gurskaya, Y. G. Yanushevich, A. F. Fradkov, K. A. Lukyanov, S. A. Lukyanov and M. V. Matz (2002). "Diversity and evolution of the green fluorescent protein family." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**(7): 4256-61.
141. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
142. Lagaudriere-Gesbert, C., S. Lebel-Binay, C. Hubeau, D. Fradelizi and H. Conjeaud (1998). "Signaling through the tetraspanin CD82 triggers its

- association with the cytoskeleton leading to sustained morphological changes and T cell activation." *Eur. J. Immunol.* **28**(12): 4332-44.
143. Lakkaraju, A. and E. Rodriguez-Boulan (2008). "Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity." *Trends Cell Biol.* **18**(5): 199-209.
 144. Larochelle, A., J. M. Gillette, R. Desmond, B. Ichwan, A. Cantilena, A. Cerf, A. J. Barrett, A. S. Wayne, J. Lippincott-Schwartz and C. E. Dunbar (2012). "Bone marrow homing and engraftment of human hematopoietic stem and progenitor cells is mediated by a polarized membrane domain." *Blood* **119**(8): 1848-55.
 145. Larson, B. L., J. Ylostalo, R. H. Lee, C. Gregory and D. J. Prockop (2010). "Sox11 is expressed in early progenitor human multipotent stromal cells and decreases with extensive expansion of the cells." *Tissue Eng Part A* **16**(11): 3385-94.
 146. Latchman, D. S. (1997). "Transcription factors: an overview." *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**(12): 1305-12.
 147. Lee, N., W. C. Wang and M. Fukuda (1990). "Granulocytic differentiation of HL-60 cells is associated with increase of poly-N-acetyllactosamine in Asn-linked oligosaccharides attached to human lysosomal membrane glycoproteins." *J. Biol. Chem.* **265**(33): 20476-87.
 148. Lee, T. I. and R. A. Young (2000). "Transcription of eukaryotic protein-coding genes." *Annu. Rev. Genet.* **34**: 77-137.
 149. Lefebvre, V., W. Huang, V. R. Harley, P. N. Goodfellow and B. de Crombrughe (1997). "SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene." *Mol. Cell. Biol.* **17**(4): 2336-46.
 150. Leung, K. T., K. Y. Chan, P. C. Ng, T. K. Lau, W. M. Chiu, K. S. Tsang, C. K. Li, C. K. Kong and K. Li (2010). "The tetraspanin CD9 regulates migration, adhesion, and homing of human cord blood CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells." *Blood* **117**(6): 1840-50.
 151. Leung, K. T., K. Y. Chan, P. C. Ng, T. K. Lau, W. M. Chiu, K. S. Tsang, C. K. Li, C. K. Kong and K. Li (2011). "The tetraspanin CD9 regulates migration, adhesion, and homing of human cord blood CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells." *Blood* **117**(6): 1840-50.
 152. Leurs, C., M. Jansen, K. E. Pollok, M. Heinkelein, M. Schmidt, M. Wissler, D. Lindemann, C. Von Kalle, A. Rethwilm, D. A. Williams and H. Hanenberg (2003). "Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells." *Hum. Gene Ther.* **14**(6): 509-19.
 153. Levy, S., V. Q. Nguyen, M. L. Andria and S. Takahashi (1991). "Structure and membrane topology of TAPA-1." *J. Biol. Chem.* **266**(22): 14597-602.
 154. Levy, S. and T. Shoham (2005). "Protein-protein interactions in the tetraspanin web." *Physiology (Bethesda, Md.)* **20**: 218-224.
 155. Levy, S. and T. Shoham (2005). "The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes." *Nat Rev Immunol* **5**(2): 136-48.
 156. Lin, H. (2002). "The stem-cell niche theory: lessons from flies." *Nature Reviews. Genetics* **3**(12): 931-940.
 157. Lin, K. K., L. Rossi, N. C. Boles, B. E. Hall, T. C. George and M. A. Goodell (2011). "CD81 is essential for the re-entry of hematopoietic stem cells to quiescence following stress-induced proliferation via deactivation of the Akt pathway." *PLoS Biol* **9**(9): e1001148.
 158. Liu, W. M., F. Zhang, S. Moshiah, B. Zhou, C. Huang, K. Srinivasan, S. Khurana, Y. Zheng, J. M. Lahti and X. A. Zhang (2012). "Tetraspanin CD82

- inhibits protrusion and retraction in cell movement by attenuating the plasma membrane-dependent actin organization." *PLoS One* **7**(12): e51797.
159. Ludwig, A. K. and B. Giebel (2011). "Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication." *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**(1): 11-5.
 160. Macejak, D. G. and P. Sarnow (1991). "Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA." *Nature* **353**(6339): 90-4.
 161. Mani, S. A., W. Guo, M. J. Liao, E. N. Eaton, A. Ayyanan, A. Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C. C. Zhang, M. Shipitsin, L. L. Campbell, K. Polyak, C. Briskin, J. Yang and R. A. Weinberg (2008). "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells." *Cell* **133**(4): 704-15.
 162. Manz, M. G., T. Miyamoto, K. Akashi and I. L. Weissman (2002). "Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**(18): 11872-7.
 163. Mathivanan, S. and R. J. Simpson (2009). "ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA." *Proteomics* **9**(21): 4997-5000.
 164. Mayani, H., W. Dragowska and P. M. Lansdorp (1993). "Lineage commitment in human hemopoiesis involves asymmetric cell division of multipotent progenitors and does not appear to be influenced by cytokines." *J. Cell. Physiol.* **157**(3): 579-86.
 165. Medvinsky, A. and E. Dzierzak (1996). "Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region." *Cell* **86**(6): 897-906.
 166. Meiering, C. D. and M. L. Linial (2001). "Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection." *Clin. Microbiol. Rev.* **14**(1): 165-76.
 167. Meng, X., A. Neises, R. J. Su, K. J. Payne, L. Ritter, D. S. Gridley, J. Wang, M. Sheng, K. H. Lau, D. J. Baylink and X. B. Zhang (2011). "Efficient reprogramming of human cord blood CD34+ cells into induced pluripotent stem cells with OCT4 and SOX2 alone." *Mol Ther* **20**(2): 408-16.
 168. Metzelaar, M. J. and H. K. Nieuwenhuis (1991). "Identity of Pltgp40 and lysosomal integral membrane protein-CD63." *Blood* **78**(2): 534-5.
 169. Metzelaar, M. J., P. L. Wijngaard, P. J. Peters, J. J. Sixma, H. K. Nieuwenhuis and H. C. Clevers (1991). "CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells." *J. Biol. Chem.* **266**(5): 3239-45.
 170. Mitchell, P. J. and R. Tjian (1989). "Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins." *Science* **245**(4916): 371-8.
 171. Mittelbrunn, M., M. Yanez-Mo, D. Sancho, A. Ursa and F. Sanchez-Madrid (2002). "Cutting edge: dynamic redistribution of tetraspanin CD81 at the central zone of the immune synapse in both T lymphocytes and APC." *J. Immunol.* **169**(12): 6691-5.
 172. Miyazaki, K., M. Miyazaki, Y. Guo, N. Yamasaki, M. Kanno, Z. Honda, H. Oda, H. Kawamoto and H. Honda (2010). "The role of the basic helix-loop-helix transcription factor Dec1 in the regulatory T cells." *J. Immunol.* **185**(12): 7330-9.
 173. Mizuguchi, H., Z. Xu, A. Ishii-Watabe, E. Uchida and T. Hayakawa (2000). "IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector." *Mol Ther* **1**(4): 376-82.
 174. Mochizuki, H., J. P. Schwartz, K. Tanaka, R. O. Brady and J. Reiser (1998). "High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells." *J. Virol.* **72**(11): 8873-83.
 175. Moldavan, A. (1934). "Photo-Electric Technique for the Counting of Microscopical Cells." *Science* **80**(2069): 188-9.

176. Moore, D. L., M. G. Blackmore, Y. Hu, K. H. Kaestner, J. L. Bixby, V. P. Lemmon and J. L. Goldberg (2009). "KLF family members regulate intrinsic axon regeneration ability." *Science* **326**(5950): 298-301.
177. Moore, K. A. (2004). "Recent advances in defining the hematopoietic stem cell niche." *Curr. Opin. Hematol.* **11**(2): 107-111.
178. Moore, K. A. and I. R. Lemischka (2006). "Stem cells and their niches." *Science (New York, N.Y.)* **311**(5769): 1880-1885.
179. Morrison, S. J., A. M. Wandycz, H. D. Hemmati, D. E. Wright and I. L. Weissman (1997). "Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors." *Development (Cambridge, England)* **124**(10): 1929-1939.
180. Mozos, A., C. Royo, E. Hartmann, D. De Jong, C. Baro, A. Valera, K. Fu, D. D. Weisenburger, J. Delabie, S. S. Chuang, E. S. Jaffe, C. Ruiz-Marcellan, S. Dave, L. Rimsza, R. Braziel, R. D. Gascoyne, F. Sole, A. Lopez-Guillermo, D. Colomer, L. M. Staudt, A. Rosenwald, G. Ott, P. Jares and E. Campo (2009). "SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype." *Haematologica* **94**(11): 1555-62.
181. Mu, F. T., J. M. Callaghan, O. Steele-Mortimer, H. Stenmark, R. G. Parton, P. L. Campbell, J. McCluskey, J. P. Yeo, E. P. Tock and B. H. Toh (1995). "EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif." *J. Biol. Chem.* **270**(22): 13503-11.
182. Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51 Pt 1**: 263-73.
183. Nagamura-Inoue, T., T. Tamura and K. Ozato (2001). "Transcription factors that regulate growth and differentiation of myeloid cells." *Int. Rev. Immunol.* **20**(1): 83-105.
184. Nassour, M., Y. Idoux-Gillet, A. Selmi, C. Come, M. L. Faraldo, M. A. Deugnier and P. Savagner (2012). "Slug controls stem/progenitor cell growth dynamics during mammary gland morphogenesis." *PLoS One* **7**(12): e53498.
185. Naviaux, R. K., E. Costanzi, M. Haas and I. M. Verma (1996). "The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses." *J. Virol.* **70**(8): 5701-5.
186. Nieto, M. A. (2002). "The snail superfamily of zinc-finger transcription factors." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(3): 155-66.
187. Nikolov, D. B. and S. K. Burley (1997). "RNA polymerase II transcription initiation: a structural view." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**(1): 15-22.
188. Nishida, H., H. Yamazaki, T. Yamada, S. Iwata, N. H. Dang, T. Inukai, K. Sugita, Y. Ikeda and C. Morimoto (2009). "CD9 correlates with cancer stem cell potentials in human B-acute lymphoblastic leukemia cells." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **382**(1): 57-62.
189. Novershtern, N., A. Subramanian, L. N. Lawton, R. H. Mak, W. N. Haining, M. E. McConkey, N. Habib, N. Yosef, C. Y. Chang, T. Shay, G. M. Frampton, A. C. Drake, I. Leskov, B. Nilsson, F. Preffer, D. Dombkowski, J. W. Evans, T. Liefeld, J. S. Smutko, J. Chen, N. Friedman, R. A. Young, T. R. Golub, A. Regev and B. L. Ebert (2011). "Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis." *Cell* **144**(2): 296-309.
190. Oka, M., K. Tagoku, T. L. Russell, Y. Nakano, T. Hamazaki, E. M. Meyer, T. Yokota and N. Terada (2002). "CD9 is associated with leukemia inhibitory factor-mediated maintenance of embryonic stem cells." *Mol. Biol. Cell* **13**(4): 1274-81.

191. Olmos, E., B. Reiss and K. Dekker (2003). "The ekeko mutant demonstrates a role for tetraspanin-like protein in plant development." Biochem. Biophys. Res. Commun. **310**(4): 1054-61.
192. Oren, R., S. Takahashi, C. Doss, R. Levy and S. Levy (1990). "TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins." Mol. Cell. Biol. **10**(8): 4007-15.
193. Orkin, S. H. (1995). "Transcription factors and hematopoietic development." J. Biol. Chem. **270**(10): 4955-8.
194. Ory, D. S., B. A. Neugeboren and R. C. Mulligan (1996). "A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **93**(21): 11400-6.
195. Osawa, M., K. Hanada, H. Hamada and H. Nakauchi (1996). "Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell." Science (New York, N.Y.) **273**(5272): 242-245.
196. Ostrowski, M., N. B. Carmo, S. Krumeich, I. Fanget, G. Raposo, A. Savina, C. F. Moita, K. Schauer, A. N. Hume, R. P. Freitas, B. Goud, P. Benaroch, N. Hacohen, M. Fukuda, C. Desnos, M. C. Seabra, F. Darchen, S. Amigorena, L. F. Moita and C. Thery (2010). "Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway." Nat Cell Biol **12**(1): 19-30; sup pp 1-13.
197. Ota, T., Y. Suzuki, T. Nishikawa, T. Otsuki, T. Sugiyama, R. Irie, A. Wakamatsu, K. Hayashi, H. Sato, K. Nagai, K. Kimura, H. Makita, M. Sekine, M. Obayashi, T. Nishi, T. Shibahara, T. Tanaka, S. Ishii, J. Yamamoto, K. Saito, Y. Kawai, Y. Isono, Y. Nakamura, K. Nagahari, K. Murakami, T. Yasuda, T. Iwayanagi, M. Wagatsuma, A. Shiratori, H. Sudo, T. Hosoiri, Y. Kaku, H. Kodaira, H. Kondo, M. Sugawara, M. Takahashi, K. Kanda, T. Yokoi, T. Furuya, E. Kikkawa, Y. Omura, K. Abe, K. Kamihara, N. Katsuta, K. Sato, M. Tanikawa, M. Yamazaki, K. Ninomiya, T. Ishibashi, H. Yamashita, K. Murakawa, K. Fujimori, H. Tanai, M. Kimata, M. Watanabe, S. Hiraoka, Y. Chiba, S. Ishida, Y. Ono, S. Takiguchi, S. Watanabe, M. Yosida, T. Hotuta, J. Kusano, K. Kanehori, A. Takahashi-Fujii, H. Hara, T. O. Tanase, Y. Nomura, S. Togiya, F. Komai, R. Hara, K. Takeuchi, M. Arita, N. Imose, K. Musashino, H. Yuuki, A. Oshima, N. Sasaki, S. Aotsuka, Y. Yoshikawa, H. Matsunawa, T. Ichihara, N. Shiohata, S. Sano, S. Moriya, H. Momiyama, N. Satoh, S. Takami, Y. Terashima, O. Suzuki, S. Nakagawa, A. Senoh, H. Mizoguchi, Y. Goto, F. Shimizu, H. Wakebe, H. Hishigaki, T. Watanabe, A. Sugiyama, M. Takemoto, B. Kawakami, K. Watanabe, A. Kumagai, S. Itakura, Y. Fukuzumi, Y. Fujimori, M. Komiyama, H. Tashiro, A. Tanigami, T. Fujiwara, T. Ono, K. Yamada, Y. Fujii, K. Ozaki, M. Hirao, Y. Ohmori, A. Kawabata, T. Hikiji, N. Kobatake, H. Inagaki, Y. Ikema, S. Okamoto, R. Okitani, T. Kawakami, S. Noguchi, T. Itoh, K. Shigeta, T. Senba, K. Matsumura, Y. Nakajima, T. Mizuno, M. Morinaga, M. Sasaki, T. Togashi, M. Oyama, H. Hata, T. Komatsu, J. Mizushima-Sugano, T. Satoh, Y. Shirai, Y. Takahashi, K. Nakagawa, K. Okumura, T. Nagase, N. Nomura, H. Kikuchi, Y. Masuho, R. Yamashita, K. Nakai, T. Yada, O. Ohara, T. Isogai and S. Sugano (2004). "Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs." Nat. Genet. **36**(1): 40-5.
198. Otsubo, T., Y. Akiyama, K. Yanagihara and Y. Yuasa (2008). "SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis." Br. J. Cancer **98**(4): 824-31.

199. Pelletier, J. and N. Sonenberg (1988). "Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA." Nature **334**(6180): 320-5.
200. Penas, P. F., A. Garcia-Diez, F. Sanchez-Madrid and M. Yanez-Mo (2000). "Tetraspanins are localized at motility-related structures and involved in normal human keratinocyte wound healing migration." J. Invest. Dermatol. **114**(6): 1126-35.
201. Pierzchalski, A., A. Mittag and A. Tarnok (2011). "Introduction A: recent advances in cytometry instrumentation, probes, and methods--review." Methods Cell Biol. **102**: 1-21.
202. Ptashne, M. and A. Gann (1997). "Transcriptional activation by recruitment." Nature **386**(6625): 569-77.
203. Punzel, M., T. Zhang, D. Liu, V. Eckstein and A. D. Ho (2002). "Functional analysis of initial cell divisions defines the subsequent fate of individual human CD34(+)CD38(-) cells." Exp. Hematol. **30**(5): 464-72.
204. Radoska, H. S., C. S. Huettner, P. Zhang, T. Cheng, D. T. Scadden and D. G. Tenen (1998). "CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors." Mol. Cell. Biol. **18**(7): 4301-14.
205. Radsak, K., R. Fuhrmann, R. P. Franke, D. Schneider, A. Kollert, K. H. Brucher and D. Drenckhahn (1989). "Induction by sodium butyrate of cytomegalovirus replication in human endothelial cells." Arch. Virol. **107**(1-2): 151-8.
206. Rajendran, L., J. Beckmann, A. Magenau, E. M. Boneberg, K. Gaus, A. Viola, B. Giebel and H. Illges (2009). "Flotillins are involved in the polarization of primitive and mature hematopoietic cells." PLoS One **4**(12): e8290.
207. Rana, S. and M. Zoller (2011). "Exosome target cell selection and the importance of exosomal tetraspanins: a hypothesis." Biochem. Soc. Trans. **39**(2): 559-62.
208. Rangan, S. R. (1972). "A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma." Cancer **29**(1): 117-21.
209. Raposo, G., H. W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C. V. Harding, C. J. Melief and H. J. Geuze (1996). "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles." J. Exp. Med. **183**(3): 1161-72.
210. Rasheed, S., W. A. Nelson-Rees, E. M. Toth, P. Arnstein and M. B. Gardner (1974). "Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080)." Cancer **33**(4): 1027-33.
211. Rink, J., E. Ghigo, Y. Kalaidzidis and M. Zerial (2005). "Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes." Cell **122**(5): 735-49.
212. Roeder, R. G. (1996). "The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II." Trends Biochem. Sci. **21**(9): 327-35.
213. Roegiers, F. and Y. N. Jan (2004). "Asymmetric cell division." Curr. Opin. Cell Biol. **16**(2): 195-205.
214. Rossi, D. J., C. H. M. Jamieson and I. L. Weissman (2008). "Stem cells and the pathways to aging and cancer." Cell **132**(4): 681-696.
215. Rubinstein, E., F. Le Naour, M. Billard, M. Prenant and C. Boucheix (1994). "CD9 antigen is an accessory subunit of the VLA integrin complexes." Eur. J. Immunol. **24**(12): 3005-13.
216. Rubinstein, E., F. Le Naour, C. Lagaudriere-Gesbert, M. Billard, H. Conjeaud and C. Boucheix (1996). "CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins." Eur. J. Immunol. **26**(11): 2657-65.

217. Ruzankina, Y. and E. J. Brown (2007). "Relationships between stem cell exhaustion, tumour suppression and ageing." Br. J. Cancer **97**(9): 1189-1193.
218. Salzer, U. and R. Prohaska (2001). "Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts." Blood **97**(4): 1141-3.
219. Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **74**(12): 5463-7.
220. Sarkar, A. and K. Hochedlinger (2013). "The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate." Cell Stem Cell **12**(1): 15-30.
221. Sauvageau, G., P. M. Lansdorp, C. J. Eaves, D. E. Hogge, W. H. Dragowska, D. S. Reid, C. Largman, H. J. Lawrence and R. K. Humphries (1994). "Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **91**(25): 12223-12227.
222. Savagner, P. (2001). "Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition." Bioessays **23**(10): 912-23.
223. Schiedlmeier, B., A. C. Santos, A. Ribeiro, N. Moncaut, D. Lesinski, H. Auer, K. Kornacker, W. Ostertag, C. Baum, M. Mallo and H. Klump (2007). "HOXB4's road map to stem cell expansion." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **104**(43): 16952-7.
224. Schwartz-Albiez, R., B. Dörken, W. Hofmann and G. Moldenhauer (1988). "The B cell-associated CD37 antigen (gp40-52). Structure and subcellular expression of an extensively glycosylated glycoprotein." Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) **140**(3): 905-914.
225. Schwartz-Albiez, R., B. Dörken, W. Hofmann and G. Moldenhauer (1988). "The B cell-associated CD37 antigen (gp40-52). Structure and subcellular expression of an extensively glycosylated glycoprotein." J. Immunol. **140**(3): 905-14.
226. Scita, G. and P. P. Di Fiore (2010). "The endocytic matrix." Nature **463**(7280): 464-73.
227. Scott, L. M., C. I. Civin, P. Rorth and A. D. Friedman (1992). "A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells." Blood **80**(7): 1725-35.
228. Seimiya, M., A. Wada, K. Kawamura, A. Sakamoto, Y. Ohkubo, S. Okada, M. Hatano, T. Tokuhisa, T. Watanabe, H. Saisho, M. Tagawa and O. W. J (2004). "Impaired lymphocyte development and function in Clast5/Stra13/DEC1-transgenic mice." Eur. J. Immunol. **34**(5): 1322-32.
229. Seo, K. W., K. H. Roh, D. R. Bhandari, S. B. Park, S. K. Lee and K. S. Kang (2013). "ZNF281 Knockdown Induced Osteogenic Differentiation of Human Multipotent Stem Cells In Vivo and In Vitro." Cell Transplant. **22**(1): 29-40.
230. Shaner, N. C., P. A. Steinbach and R. Y. Tsien (2005). "A guide to choosing fluorescent proteins." Nat Methods **2**(12): 905-9.
231. Sharpless, N. E. and R. A. DePinho (2007). "How stem cells age and why this makes us grow old." Nature Reviews. Molecular Cell Biology **8**(9): 703-713.
232. Shie, J. L., Z. Y. Chen, M. Fu, R. G. Pestell and C. C. Tseng (2000). "Gut-enriched Kruppel-like factor represses cyclin D1 promoter activity through Sp1 motif." Nucleic Acids Res **28**(15): 2969-76.
233. Shimokawa, T., K. Okumura and C. Ra (2000). "DNA induces apoptosis in electroporated human promonocytic cell line U937." Biochem. Biophys. Res. Commun. **270**(1): 94-9.
234. Shivdasani, R. A. and S. H. Orkin (1996). "The transcriptional control of hematopoiesis." Blood **87**(10): 4025-39.

235. Shmelkov, S. V., S. Meeus, N. Moussazadeh, P. Kermani, W. K. Rashbaum, S. Y. Rabbany, M. A. Hanson, W. J. Lane, R. St Clair, K. A. Walsh, S. Dias, J. T. Jacobson, B. L. Hempstead, J. M. Edelberg and S. Rafii (2005). "Cytokine preconditioning promotes codifferentiation of human fetal liver CD133+ stem cells into angiomyogenic tissue." Circulation **111**(9): 1175-83.
236. Shmelkov, S. V., R. St Clair, D. Lyden and S. Rafii (2005). "AC133/CD133/Prominin-1." Int. J. Biochem. Cell Biol. **37**(4): 715-9.
237. Sigvardsson, M. (2009). "New light on the biology and developmental potential of haematopoietic stem cells and progenitor cells." J. Intern. Med. **266**(4): 311-324.
238. Sincock, P. M., S. Fitter, R. G. Parton, M. C. Berndt, J. R. Gamble and L. K. Ashman (1999). "PETA-3/CD151, a member of the transmembrane 4 superfamily, is localised to the plasma membrane and endocytic system of endothelial cells, associates with multiple integrins and modulates cell function." J. Cell Sci. **112** (Pt 6): 833-44.
239. Soneoka, Y., P. M. Cannon, E. E. Ramsdale, J. C. Griffiths, G. Romano, S. M. Kingsman and A. J. Kingsman (1995). "A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors." Nucleic Acids Res **23**(4): 628-33.
240. Sonnichsen, B., S. De Renzis, E. Nielsen, J. Rietdorf and M. Zerial (2000). "Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11." J. Cell Biol. **149**(4): 901-14.
241. Spradling, A., D. Drummond-Barbosa and T. Kai (2001). "Stem cells find their niche." Nature **414**(6859): 98-104.
242. Stacey, K. J., I. L. Ross and D. A. Hume (1993). "Electroporation and DNA-dependent cell death in murine macrophages." Immunol. Cell Biol. **71** (Pt 2): 75-85.
243. Stepanenko, O. V., V. V. Verkhusa, I. M. Kuznetsova, V. N. Uversky and K. K. Turoverov (2008). "Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes." Curr Protein Pept Sci **9**(4): 338-69.
244. Stipp, C. S., T. V. Kolesnikova and M. E. Hemler (2003). "Functional domains in tetraspanin proteins." Trends Biochem. Sci. **28**(2): 106-112.
245. Stockl, S., R. Bauer, A. Bosserhoff, C. Gottl, J. Grifka and S. Grassel (2013). "Sox9 modulates cell survival and adipogenic differentiation of multipotent adult rat mesenchymal stem cells." J. Cell Sci.
246. Sun, H., B. Lu, R. Q. Li, R. A. Flavell and R. Taneja (2001). "Defective T cell activation and autoimmune disorder in Stra13-deficient mice." Nat Immunol **2**(11): 1040-7.
247. Sun, H. and R. Taneja (2000). "Stra13 expression is associated with growth arrest and represses transcription through histone deacetylase (HDAC)-dependent and HDAC-independent mechanisms." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **97**(8): 4058-63.
248. Swanson, J. A. (2008). "Shaping cups into phagosomes and macropinosomes." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(8): 639-49.
249. Szollosi, J., V. Horejsi, L. Bene, P. Angelisova and S. Damjanovich (1996). "Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY." J. Immunol. **157**(7): 2939-46.

250. Taichman, R. S. (2005). "Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche." Blood **105**(7): 2631-2639.
251. Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." Cell **131**(5): 861-872.
252. Tarrant, J. M., L. Robb, A. B. van Spriel and M. D. Wright (2003). "Tetraspanins: molecular organisers of the leukocyte surface." Trends Immunol **24**(11): 610-7.
253. Temin, H. M. and S. Mizutani (1970). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus." Nature **226**(5252): 1211-3.
254. Tenen, D. G., R. Hromas, J. D. Licht and D. E. Zhang (1997). "Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia." Blood **90**(2): 489-519.
255. Thery, C., A. Regnault, J. Garin, J. Wolfers, L. Zitvogel, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo and S. Amigorena (1999). "Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73." J. Cell Biol. **147**(3): 599-610.
256. Thomas, E. D., H. L. Lochte, J. H. Cannon, O. D. Sahler and J. W. Ferrebee (1959). "Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man." The Journal of Clinical Investigation **38**: 1709-1716.
257. Till, J. E. and E. A. McCulloch (1980). "Hemopoietic stem cell differentiation." Biochim. Biophys. Acta **605**(4): 431-459.
258. Traganos, F. (1984). "Flow cytometry: principles and applications. II." Cancer Invest. **2**(3): 239-58.
259. Tran, M. H., M. S. Pearson, J. M. Bethony, D. J. Smyth, M. K. Jones, M. Duke, T. A. Don, D. P. McManus, R. Correa-Oliveira and A. Loukas (2006). "Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis." Nat. Med. **12**(7): 835-40.
260. Traub, L. M., S. I. Bannykh, J. E. Rodel, M. Aridor, W. E. Balch and S. Kornfeld (1996). "AP-2-containing clathrin coats assemble on mature lysosomes." J. Cell Biol. **135**(6 Pt 2): 1801-14.
261. Tsien, R. Y. (1998). "The green fluorescent protein." Annu. Rev. Biochem. **67**: 509-44.
262. Tsuchiya, S., Y. Kobayashi, Y. Goto, H. Okumura, S. Nakae, T. Konno and K. Tada (1982). "Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester." Cancer Res. **42**(4): 1530-1536.
263. Tsuchiya, S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno and K. Tada (1980). "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)." Int. J. Cancer **26**(2): 171-6.
264. van den Boorn, J. G., J. Dassler, C. Coch, M. Schlee and G. Hartmann (2013). "Exosomes as nucleic acid nanocarriers." Adv Drug Deliv Rev **65**(3): 331-5.
265. van Gijlswijk, R. P., J. Wiegant, R. Vervenne, R. Lasan, H. J. Tanke and A. K. Raap (1996). "Horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and fluorescent tyramides for rapid detection of chromosome-specific repeat sequences." Cytogenet. Cell Genet. **75**(4): 258-62.
266. van Niel, G., S. Charrin, S. Simoes, M. Romao, L. Rochin, P. Saftig, M. S. Marks, E. Rubinstein and G. Raposo (2011). "The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis." Dev Cell **21**(4): 708-21.

267. Verkhusha, V. V. and K. A. Lukyanov (2004). "The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins." Nat. Biotechnol. **22**(3): 289-96.
268. Vieille-Grosjean, I., V. Roullot and G. Courtois (1992). "Identification of homeobox-containing genes expressed in hematopoietic blast cells." Biochem. Biophys. Res. Commun. **185**(2): 785-792.
269. Vischer, U. M. and D. D. Wagner (1993). "CD63 is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells." Blood **82**(4): 1184-91.
270. Wakabayashi, T., K. Craessaerts, L. Bammens, M. Bentahir, F. Borgions, P. Herdewijn, A. Staes, E. Timmerman, J. Vandekerckhove, E. Rubinstein, C. Boucheix, K. Gevaert and B. De Strooper (2009). "Analysis of the gamma-secretase interactome and validation of its association with tetraspanin-enriched microdomains." Nat Cell Biol **11**(11): 1340-6.
271. Wang, J., S. Rao, J. Chu, X. Shen, D. N. Levasseur, T. W. Theunissen and S. H. Orkin (2006). "A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells." Nature **444**(7117): 364-8.
272. Wang, Z. X., C. H. Teh, C. M. Chan, C. Chu, M. Rossbach, G. Kunarso, T. B. Allapitchay, K. Y. Wong and L. W. Stanton (2008). "The transcription factor Zfp281 controls embryonic stem cell pluripotency by direct activation and repression of target genes." Stem Cells **26**(11): 2791-9.
273. Weissman, I. L. (2000). "Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities." Science (New York, N.Y.) **287**(5457): 1442-1446.
274. Weissman, I. L., D. J. Anderson and F. Gage (2001). "Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations." Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. **17**: 387-403.
275. Whitney, E. M., A. M. Ghaleb, X. Chen and V. W. Yang (2006). "Transcriptional profiling of the cell cycle checkpoint gene kruppel-like factor 4 reveals a global inhibitory function in macromolecular biosynthesis." Gene Expression **13**(2): 85-96.
276. Wilfinger, W. W., K. Mackey and P. Chomczynski (1997). "Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity." BioTechniques **22**(3): 474-6, 478-81.
277. Wilk, C. M., F. A. Schildberg, M. A. Lauterbach, R. P. Cadeddu, J. Frobel, V. Westphal, R. H. Tolba, S. W. Hell, A. Czibere, I. Bruns and R. Haas (2013). "The tissue inhibitor of metalloproteinases-1 improves migration and adhesion of hematopoietic stem and progenitor cells." Exp. Hematol.
278. Wilson, A. and A. Trumpp (2006). "Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches." Nature Reviews. Immunology **6**(2): 93-106.
279. Wodarz, A. and W. B. Huttner (2003). "Asymmetric cell division during neurogenesis in Drosophila and vertebrates." Mech. Dev. **120**(11): 1297-1309.
280. Wright, M. D., K. J. Henkle and G. F. Mitchell (1990). "An immunogenic Mr 23,000 integral membrane protein of Schistosoma mansoni worms that closely resembles a human tumor-associated antigen." J. Immunol. **144**(8): 3195-200.
281. Xu, C., Y. H. Zhang, M. Thangavel, M. M. Richardson, L. Liu, B. Zhou, Y. Zheng, R. S. Ostrom and X. A. Zhang (2009). "CD82 endocytosis and cholesterol-dependent reorganization of tetraspanin webs and lipid rafts." FASEB J. **23**(10): 3273-88.
282. Yamagata, T., K. Maki and K. Mitani (2005). "Runx1/AML1 in normal and abnormal hematopoiesis." Int. J. Hematol. **82**(1): 1-8.

-
283. Yamashita, Y. M., M. T. Fuller and D. L. Jones (2005). "Signaling in stem cell niches: lessons from the *Drosophila* germline." *J. Cell Sci.* **118**(Pt 4): 665-672.
284. Yanez-Mo, M., O. Barreiro, M. Gordon-Alonso, M. Sala-Valdes and F. Sanchez-Madrid (2009). "Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes." *Trends Cell Biol.* **19**(9): 434-46.
285. Yin, A. H., S. Miraglia, E. D. Zanjani, G. Almeida-Porada, M. Ogawa, A. G. Leary, J. Olweus, J. Kearney and D. W. Buck (1997). "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." *Blood* **90**(12): 5002-5012.
286. Yuasa, H., Y. Oike, A. Iwama, I. Nishikata, D. Sugiyama, A. Perkins, M. L. Mucenski, T. Suda and K. Morishita (2005). "Oncogenic transcription factor Evf1 regulates hematopoietic stem cell proliferation through GATA-2 expression." *EMBO J.* **24**(11): 1976-87.
287. Zacharias, D. A., G. S. Baird and R. Y. Tsien (2000). "Recent advances in technology for measuring and manipulating cell signals." *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**(3): 416-21.
288. Zacharias, D. A., J. D. Violin, A. C. Newton and R. Y. Tsien (2002). "Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells." *Science* **296**(5569): 913-6.
289. Zaidi, A. U., H. Enomoto, J. Milbrandt and K. A. Roth (2000). "Dual fluorescent in situ hybridization and immunohistochemical detection with tyramide signal amplification." *J. Histochem. Cytochem.* **48**(10): 1369-75.
290. Zhang, J., C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W.-G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J. Q. Feng, S. Harris, L. M. Wiedemann, Y. Mishina and L. Li (2003). "Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size." *Nature* **425**(6960): 836-841.
291. Zhu, J., D. M. Giannola, Y. Zhang, A. J. Rivera and S. G. Emerson (2003). "NF- κ B cooperates with USF1/2 to induce the hematopoietic expression of HOXB4." *Blood* **102**(7): 2420-2427.
292. Zoeller, M. (2009). "Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis." *Nature Reviews. Cancer* **9**(1): 40-55.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Stammzellnische	10
Abb. 1.2: Schematische Darstellung der asymmetrischen Zellteilung	11
Abb. 1.3: Schematische Darstellung der klassischen Hämatopoese.....	12
Abb. 1.4: Schematische Darstellung der klassischen und neuen Hämatopoese.	14
Abb. 1.5: Darstellung der Sortierungsstrategie zur Anreicherung von reiferen und primitiveren hämatopoetischen Vorläuferzellen.....	18
Abb. 1.5: Schematische Darstellung eines Tetraspanins innerhalb der Zellmembran. ..	20
Abb. 3.1: Primerdesign verwendeter Oligonukleotide.	62
Abb. 3.2: Abfolge der Nukleotidsequenz von CD53 (NM_001040033.1).....	66
Abb. 3.3: Abfolge der Aminosäuresequenz von CD53 (NM_001040033.1).	66
Abb. 3.4: Auswerteschema der Messwerte von stabil transduzierten CD34 ⁺ -Zellen.....	69
Abb. 3.5: Vergleich der Messwerte von transduzierten, nicht-transduzierten und nicht-manipulierten CD34 ⁺ Zellen.	70
Abb. 3.6: Ansätze ohne diskriminierbare eGFP ⁺ Population.	71
Abb. 3.7: Anteile an eGFP ⁺ und eGFP ⁻ Zellen an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transduktion.	72
Abb. 3.8: Anteile der CD34 ⁺ Zellen der eGFP-Subpopulationen an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transduktion.....	74
Abb. 3.9: Anteile der CD133 ⁺ Zellen innerhalb der eGFP ⁺ CD34 ⁺ und eGFP ⁻ CD34 ⁺ Subpopulationen an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transduktion.	75
Abb. 3.10: Anteile der CD133 ⁺ CD34 ⁺ -Zellen der eGFP ⁺ und eGFP ⁻ Subpopulationen an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transduktion.....	77
Abb. 3.11: Effekte der Transgene auf den Anteil der CD34 und CD133 positiven Zellen innerhalb der eGFP ⁺ Population im Vergleich zu den Kontrollen.	79
Abb. 3.12: Effekte der Transgene auf den Anteil der CD34 und CD133 positiven Zellen innerhalb der eGFP ⁺ Population im Vergleich zu den Kontrollen an Tag 14.	80
Abb. 3.13: Expansionsraten von Tag 3 zu Tag 14 der analysierten Populationen von manipulierten und nicht-manipulierten Zellen.	83
Abb. 3.14: Expansionsraten von Tag 3 zu Tag 14 der analysierten Populationen von manipulierten und nicht-manipulierten Zellen.	84
Abb. 3.15: Expansionsraten von Tag 3 zu Tag 14 der analysierten Populationen von manipulierten und nicht-manipulierten Zellen.	85

Abb. 3.16: Expansionsraten von Tag 3 zu Tag 14 der analysierten Populationen von manipulierten und nicht-manipulierten Zellen.	86
Abb. 3.17: Expansionsraten von Tag 3 zu Tag 14 der analysierten Populationen von manipulierten und nicht-manipulierten Zellen.	87
Abb. 3.18: Expansionsraten von Tag 3 zu Tag 14 der analysierten Populationen von manipulierten und nicht-manipulierten Zellen.	88
Abb. 3.19: Tetraspaninexpression auf nicht-manipulierten FaDu-Zellen.	97
Abb. 3.20: Tetraspaninexpression auf nicht-manipulierten N-KM-Zellen.	98
Abb. 3.21: Tetraspaninexpression auf nicht-manipulierten THP-1-Zellen (Monozyten).	99
Abb. 3.22: Tetraspaninexpression auf nicht-manipulierten THP-1-Zellen (Makrophagen).	100
Abb. 3.23: Zellsortierung am Beispiel von CD37a-eGFP transduzierten THP-1 Zellen.	101
Abb. 3.24: Durchflusszytometrische Analysen von FaDu-Zellen, die stabil mit verschiedenen Tetraspanin-eGFP Fusionsproteinen transduziert wurden.	103
Abb. 3.25: Durchflusszytometrische Analysen von N-KM-Zellen, die stabil mit verschiedenen Tetraspanin-eGFP Fusionsproteinen transduziert wurden.	104
Abb. 3.26: Durchflusszytometrische Analysen von THP1-Zellen (Monozyten), die stabil mit verschiedenen Tetraspanin-eGFP Fusionsproteinen transduziert wurden.	105
Abb. 3.27: Western Blot Analysen zum Nachweis von Tetraspanin-eGFP Fusionsproteinen und Aktin.	108
Abb. 3.28: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil die verschiedenen Tetraspanine exprimieren.	111
Abb. 3.29: Mikroskopische Aufnahmen von nicht-manipulierten Zellen.	112
Abb. 3.30: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil eGFP exprimieren.	113
Abb. 3.31: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil CD9-eGFP exprimieren.	113
Abb. 3.32: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil CD37a-eGFP exprimieren.	114
Abb. 3.33: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil CD37b-eGFP exprimieren.	114

Abb. 3.34: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil CD53-eGFP exprimieren.	115
Abb. 3.35: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil CD53s-eGFP exprimieren	115
Abb. 3.36: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil CD63-eGFP exprimieren.	116
Abb. 3.37: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil CD81-eGFP exprimieren.	116
Abb. 3.38: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil CD82-eGFP exprimieren.	117
Abb. 3.39: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil CD151-eGFP exprimieren.	117
Abb. 3.40: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil Tetraspanin-Fusionsproteine exprimieren.....	118
Abb. 3.41: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil Tetraspanin-Fusionsproteine exprimieren.....	120
Abb. 3.42: Mikroskopische Aufnahmen von N-KM-Zellen die stabil Tetraspanin-Fusionsproteine exprimieren.....	122
Abb. 7.1: Mikroskopische Aufnahmen von FaDu-Zellen die verschiedene Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine exprimieren.	174
Abb. 7.2: Mikroskopische Aufnahmen von FaDu-Zellen die verschiedene Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine exprimieren.	174
Abb. 7.3: Mikroskopische Aufnahmen von transduzierten FaDu-Zellen.....	175
Abb. 7.4: Mikroskopische Aufnahmen von transduzierten FaDu-Zellen.....	175
Abb. 7.5: Mikroskopische Aufnahmen transduzierten FaDu-Zellen.....	175
Abb. 7.6: Mikroskopische Aufnahmen von THP1-Zellen die verschiedene Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine exprimieren.	176
Abb. 7.7: Mikroskopische Aufnahmen von THP1-Zellen die verschiedene Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine exprimieren.	176
Abb. 7.8: Mikroskopische Aufnahmen von transduzierten THP1-Zellen.	177
Abb. 7.9: Mikroskopische Aufnahmen von transduzierten THP1-Zellen.	177
Abb. 7.10: Mikroskopische Aufnahmen transduzierten THP1-Zellen.	177
Abb. 7.11: Populationsanteile von transduzierten CD34 ⁺ Zellen.	178
Abb. 7.12: Proliferationswerte von transduzierten CD34 ⁺ Zellen.....	179

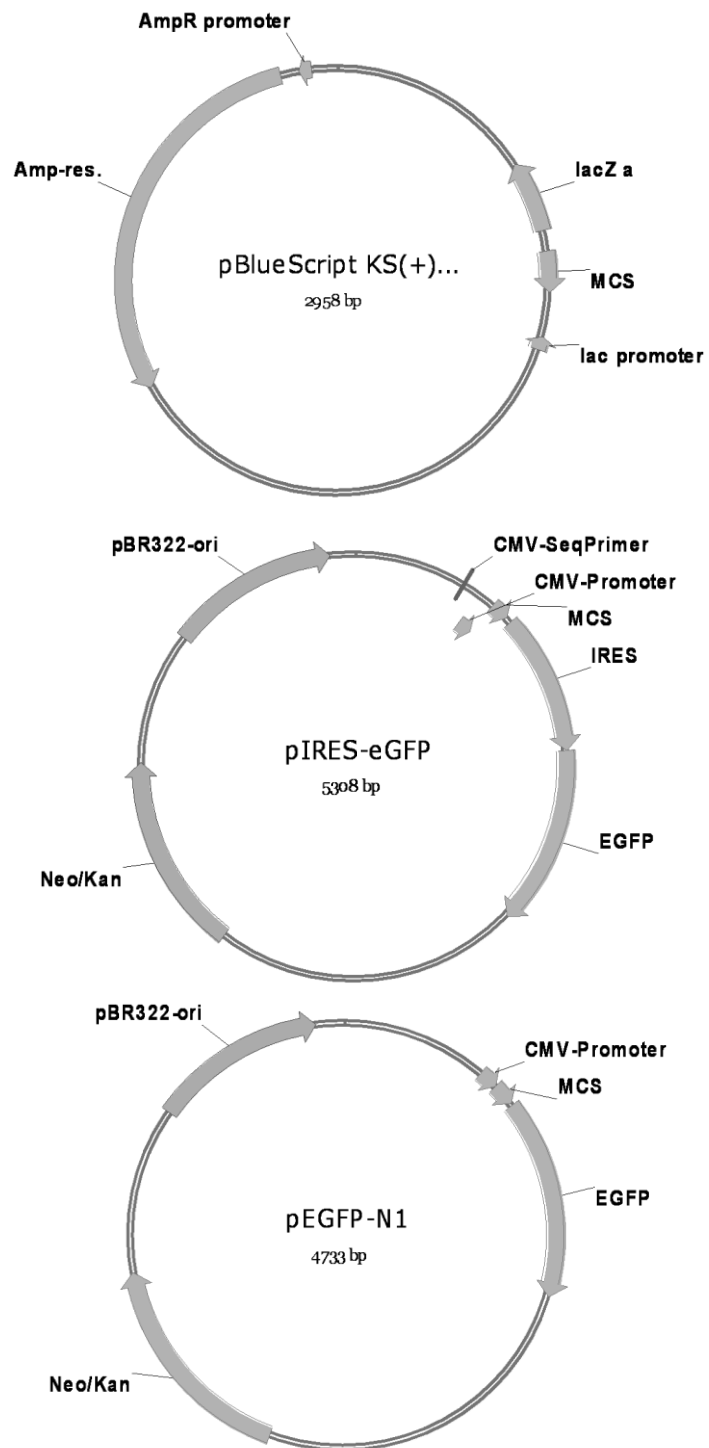
Abb. 7.13: Populationsanteile von transduzierten CD34 ⁺ Zellen.....	180
Abb. 7.14: Proliferationswerte von transduzierten CD34 ⁺ Zellen.....	181
Abb. 7.15: Populationsanteile von transduzierten CD34 ⁺ Zellen.....	182
Abb. 7.16: Proliferationswerte von transduzierten CD34 ⁺ Zellen.....	183
Abb. 7.17: Populationsanteile von transduzierten CD34 ⁺ Zellen.....	184
Abb. 7.18: Proliferationswerte von transduzierten CD34 ⁺ Zellen.....	185
Abb. 7.19: Populationsanteile von transduzierten CD34 ⁺ Zellen.....	186
Abb. 7.20: Proliferationswerte von transduzierten CD34 ⁺ Zellen.....	187
Abb. 7.21: Populationsanteile von transduzierten CD34 ⁺ Zellen.....	188
Abb. 7.22: Proliferationswerte von transduzierten CD34 ⁺ Zellen.....	189
Abb. 7.23: Populationsanteile von transduzierten CD34 ⁺ Zellen.....	190
Abb. 7.24: Proliferationswerte von transduzierten CD34 ⁺ Zellen.....	191
Abb. 7.25: Populationsanteile von transduzierten CD34 ⁺ Zellen.....	192
Abb. 7.26: Proliferationswerte von transduzierten CD34 ⁺ Zellen.....	193
Abb. 7.27: Populationsanteile von transduzierten CD34 ⁺ Zellen.....	194
Abb. 7.28: Proliferationswerte von transduzierten CD34 ⁺ Zellen.....	195

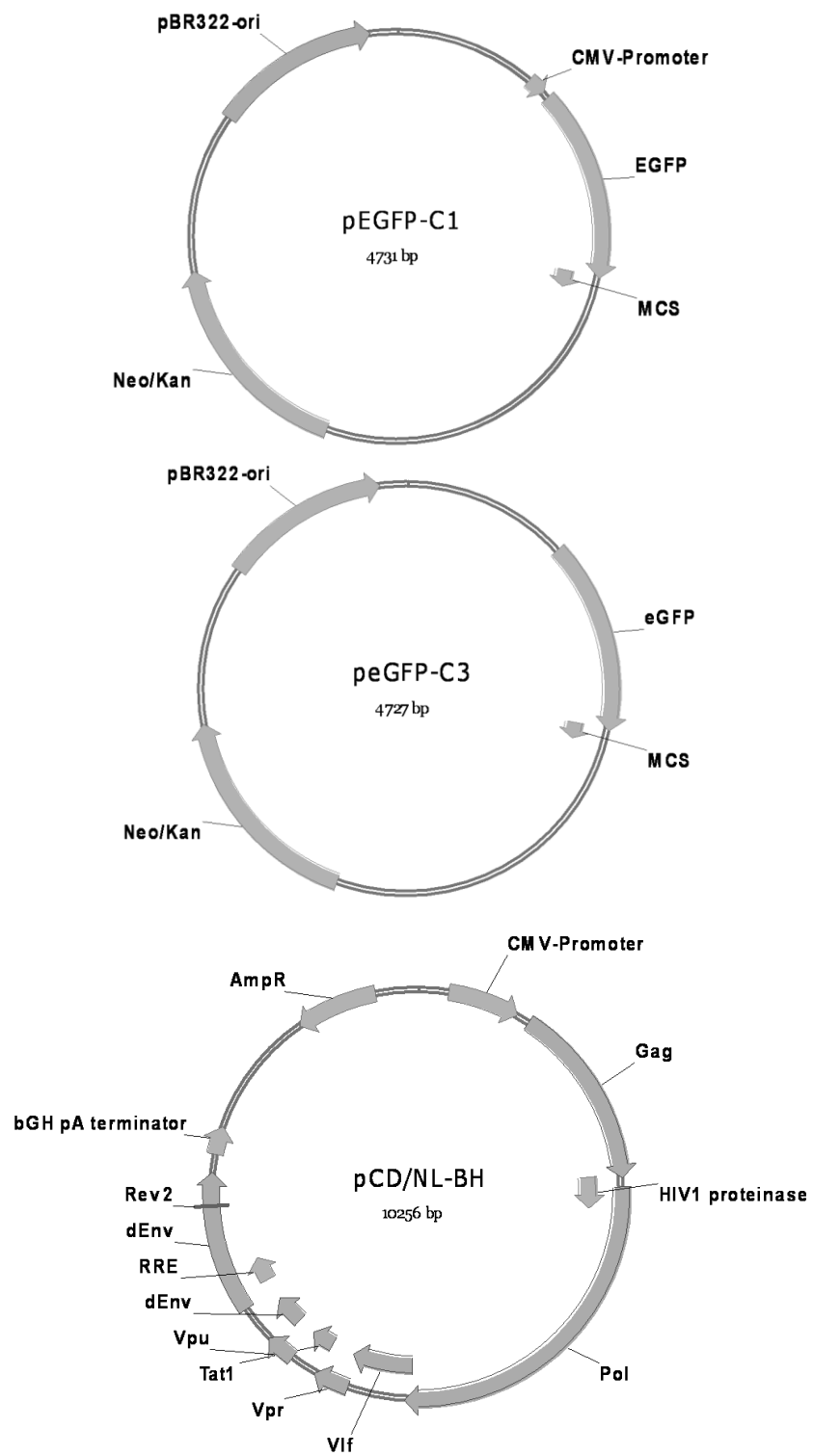
7.2 Tabellenverzeichnis

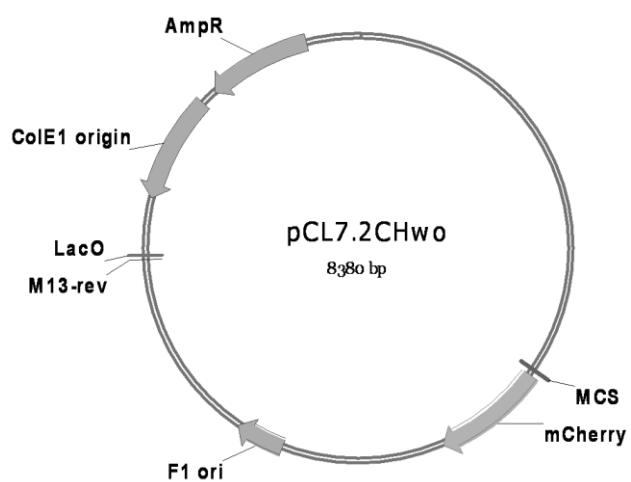
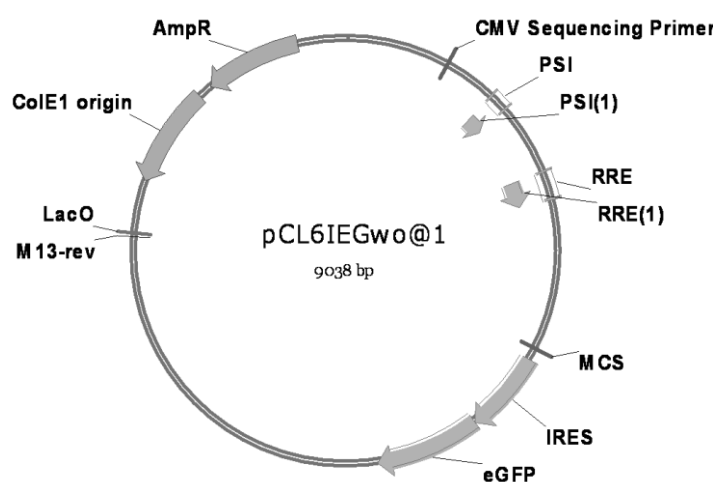
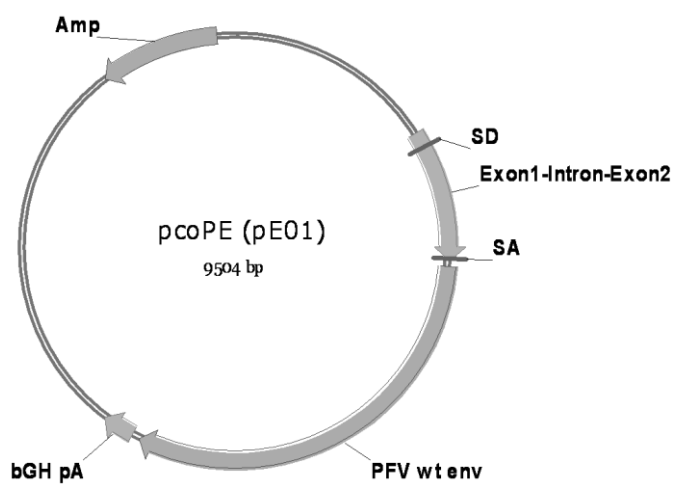
Tab. 1.1: Zur Analyse ausgewählte Kandidatengene	18
Tab. 2.1: Für PCR-Amplifikationen verwendete Oligonukleotide.....	31
Tab. 2.2: Für Sequenzierungsreaktionen verwendete Oligonukleotide.....	33
Tab. 2.3: Verwendete konjugierte Antikörper.....	34
Tab. 2.4: Verwendete unkonjugierte Antikörper.....	34
Tab. 2.5: Verwendete Sekundärantikörper.....	35
Tab. 2.6: Charakterisierung der verwendeten Plasmide.....	35
Tab. 2.7: Reaktionsansatz für die Standard PCR.....	50
Tab. 2.8: Programmeinstellungen des Thermozyklers für eine Standard PCR.....	50
Tab. 2.9: Reaktionsansatz für die Touch-Down PCR.....	51
Tab. 2.10: Programmeinstellungen des Thermozyklers für eine Touch-Down PCR.....	51
Tab. 2.11: Reaktionsansatz für die Ligation.....	55
Tab. 2.12: Erworbene cDNAs in Vektoren.....	56
Tab. 2.13: Reaktionsansatz für ein 12% Polyacrylamidgel.....	58
Tab. 3.1: Verwendete Restriktionsendonukleasen in den 5'- und 3'-Oligonukleotiden.....	63

Tab. 3.2: Überführung aus den primären Zielvektoren in lentivirale Expressionsplasmide.	64
Tab. 3.3: Zuordnung der Kandidatengene bezüglich des Anteils an eGFP ⁺ Zellen.	73
Tab. 3.4: Zuordnung der Kandidatengene bezüglich des Anteils an CD34 ⁺ Zellen.	75
Tab. 3.5: Zuordnung der Kandidatengene bezüglich des Anteils an CD133 ⁺ Zellen.	76
Tab. 3.6: Zuordnung der Kandidatengene bezüglich des Anteils an CD34/CD133 Zellen.	78
Tabelle 3.7: Effekte der Transgene auf den Anteil der CD34 und CD133 positiven Zellen innerhalb der eGFP ⁺ -Population im Vergleich zu den Kontrollen.	81
Tab. 3.8: Verwendete Restriktionsendonukleasen in 5'- und 3'-Oligonukleotiden.	93
Tab. 3.9: Überführung der Fragmente in lentivirale Vektoren.	94
Tab. 3.10: Anteil an eGFP ⁺ Zellen vor und nach der durchflusszytometrischen Sortierung.	101
Tab. 3.11: Zuordnungen der Antikörperdetektionen auf den Western Blot Membranen.	107
Tab. 3.12: Zusammenfassung der Ergebnisse mikroskopischer Analysen an N-KM-Zellen, die Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine stabil exprimieren.	125
Tab. 3.13: Zusammenfassung der Ergebnisse mikroskopischer Analysen an FaDu-Zellen, die Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine stabil exprimieren.	125
Tab. 3.14: Zusammenfassung der Ergebnisse mikroskopischer Analysen an THP1-Zellen, die Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine stabil exprimieren.	126
Tab. 7.1: P-Werte der Signifikanzberechnungen der Expansionsraten von transduzierten Zellen.	196

7.3 Verwendete Vektorplasmide.







7.4 Immunzytochemische Färbungen an transduzierten FaDu- und THP1-Zellen

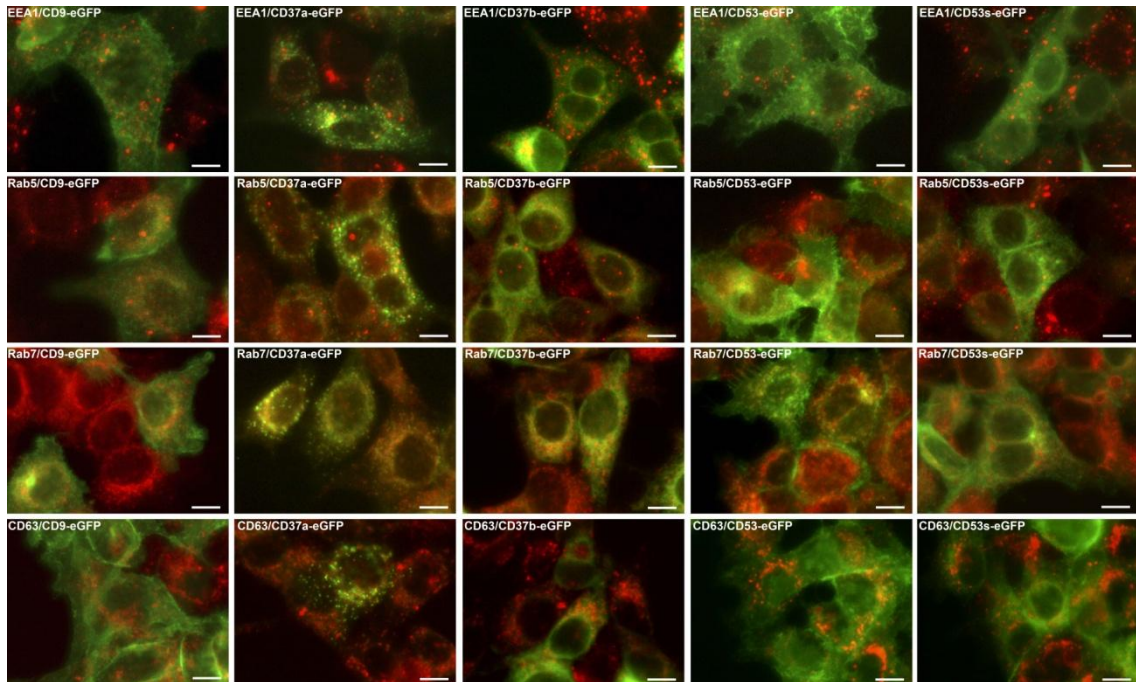


Abb. 7.1: Mikroskopische Aufnahmen von FaDu-Zellen die verschiedene Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine exprimieren.

Immunzytochemische Färbungen von frühem und spätem endosomalen Kompartiment (rot) in CD9-, CD37a-, CD37b-, CD53- und CD53s-eGFP transduzierten FaDu-Zellen. (Maßstabsbalken immer 10 µm).

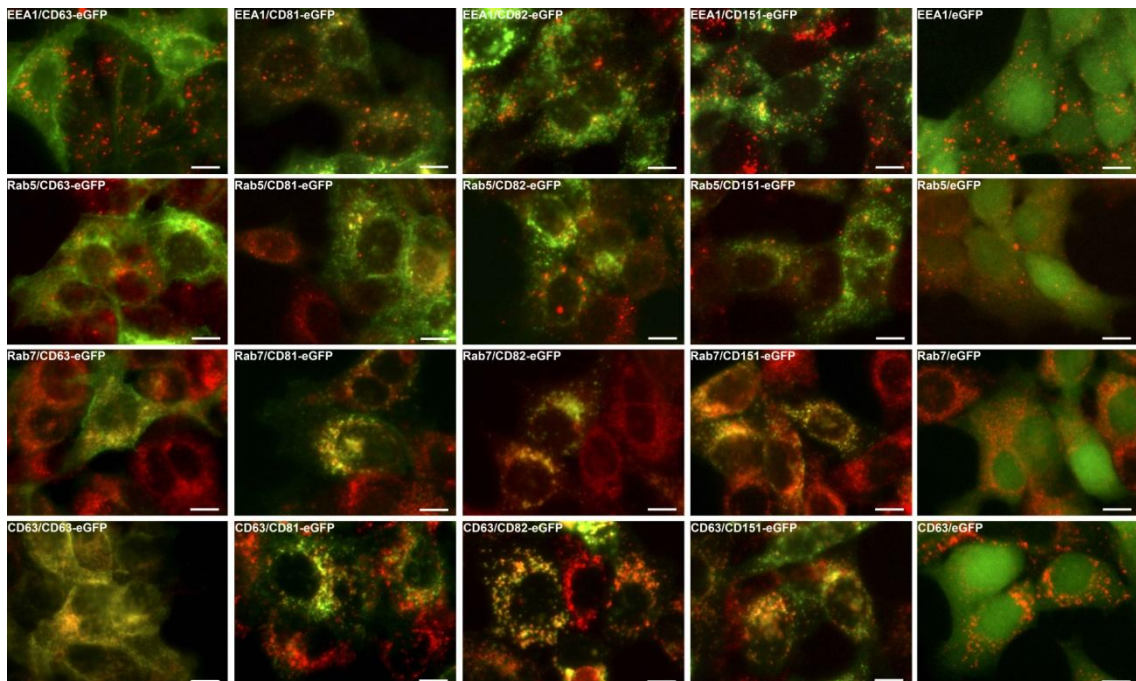


Abb. 7.2: Mikroskopische Aufnahmen von FaDu-Zellen die verschiedene Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine exprimieren.

Immunzytochemische Färbungen von frühem und spätem endosomalen Kompartiment (rot) in CD63-, CD81-, CD82-, CD151-eGFP und eGFP transduzierten FaDu-Zellen. (Maßstabsbalken immer 10 µm).

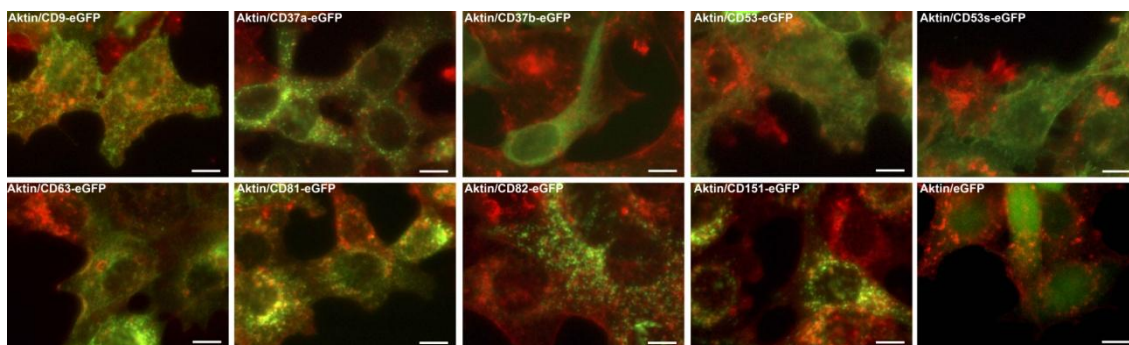


Abb. 7.3: Mikroskopische Aufnahmen von transduzierten FaDu-Zellen.

Immunzytochemische Färbungen von Aktin (rot) in Tetraspanin-eGFP transduzierten FaDu-Zellen. (Maßstabsbalken immer 10 µm).

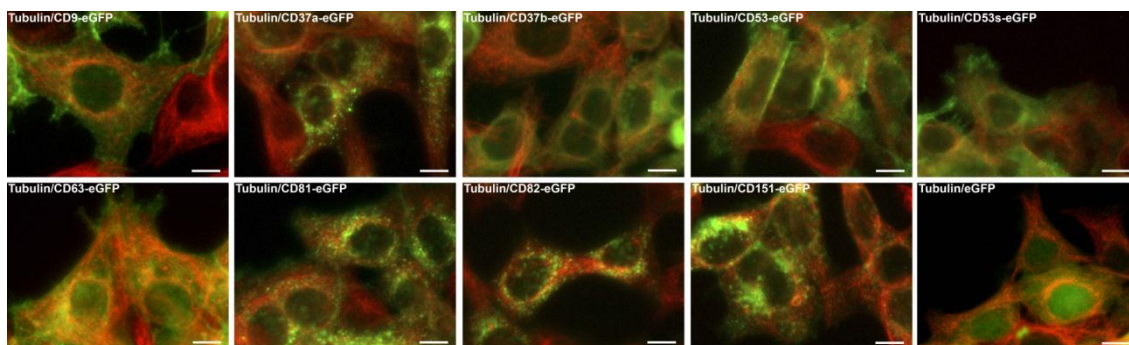


Abb. 7.4: Mikroskopische Aufnahmen von transduzierten FaDu-Zellen.

Immunzytochemische Färbungen von Tubulin (rot) in Tetraspanin-eGFP transduzierten FaDu-Zellen. (Maßstabsbalken immer 10 µm).

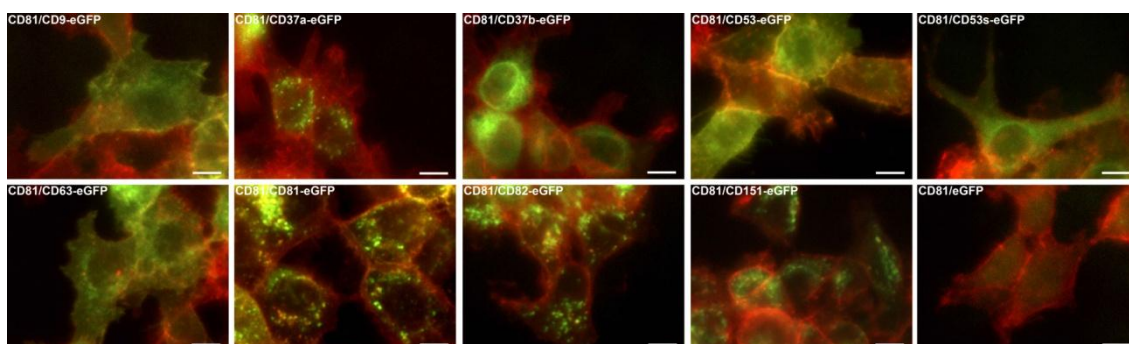


Abb. 7.5: Mikroskopische Aufnahmen transduzierten FaDu-Zellen.

Immunzytochemische Färbungen von CD81 (rot) an Tetraspanin-eGFP transduzierten FaDu-Zellen. (Maßstabsbalken immer 10 µm).

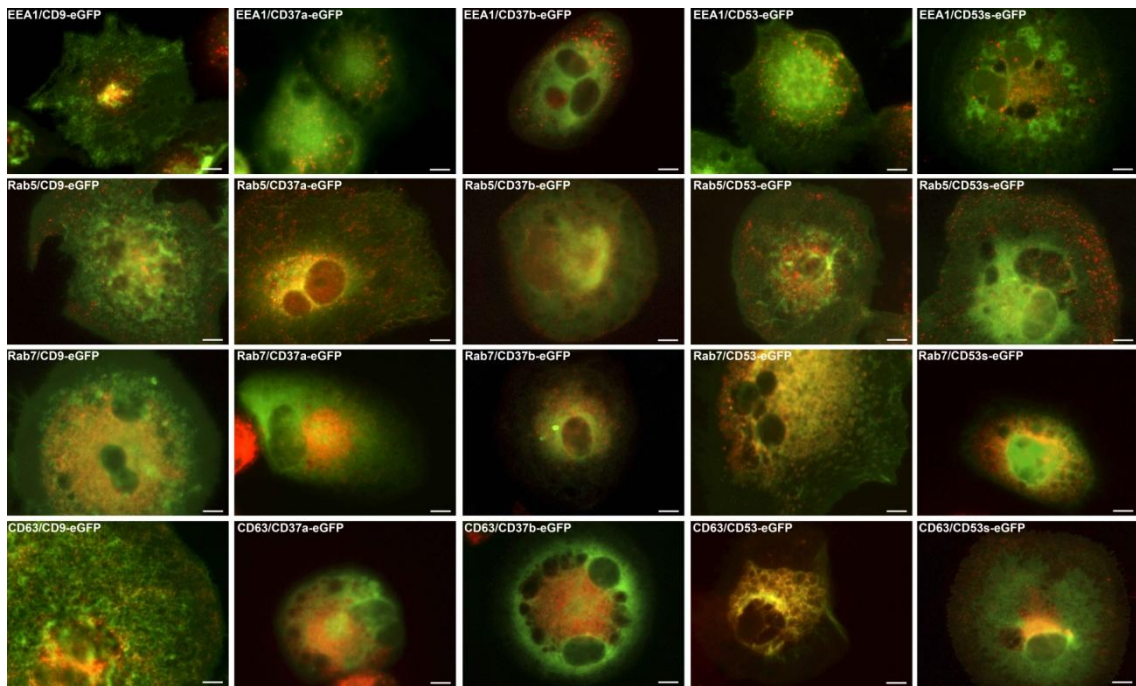


Abb. 7.6: Mikroskopische Aufnahmen von THP1-Zellen die verschiedene Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine exprimieren.

Immunzytochemische Färbungen von frühem und spätem endosomalen Kompartiment (rot) in CD9-, CD37a-, CD37b-, CD53- und CD53s-eGFP transduzierten und PMA stimulierten THP1-Zellen. (Maßstabsbalken immer 10 µm).

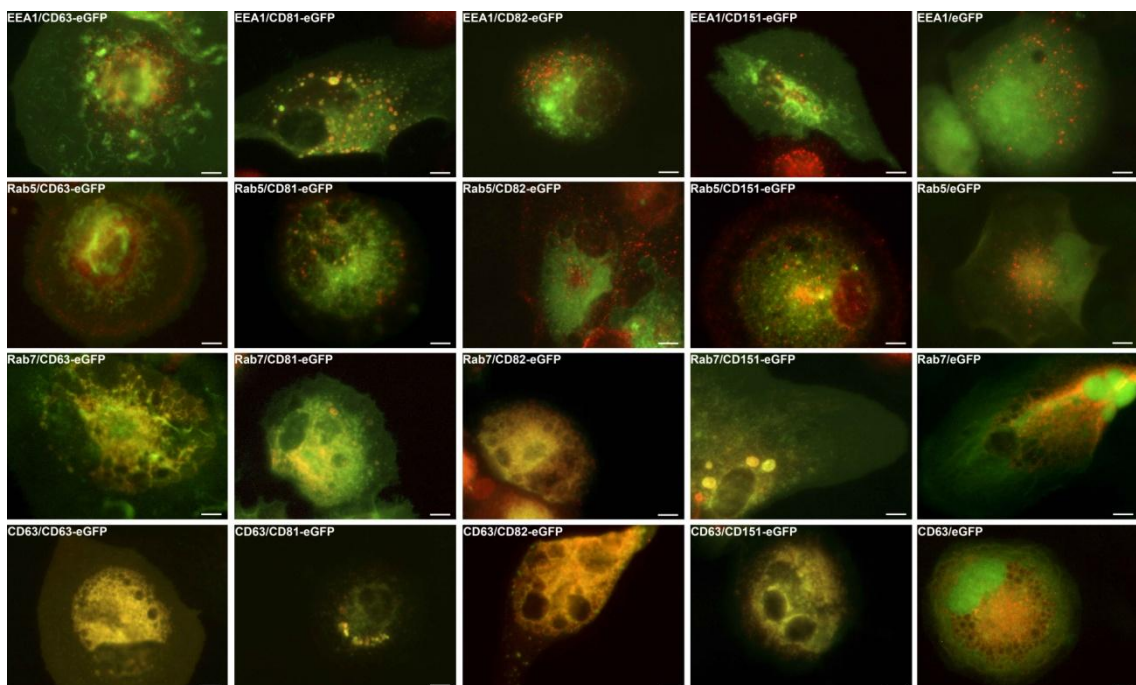


Abb. 7.7: Mikroskopische Aufnahmen von THP1-Zellen die verschiedene Tetraspanin-eGFP Fusionsproteine exprimieren.

Immunzytochemische Färbungen von frühem und spätem endosomalen Kompartiment (rot) in CD63-, CD81-, CD82-, CD151-eGFP und eGFP transduzierten und PMA stimulierten THP1-Zellen. (Maßstabsbalken immer 10 µm).

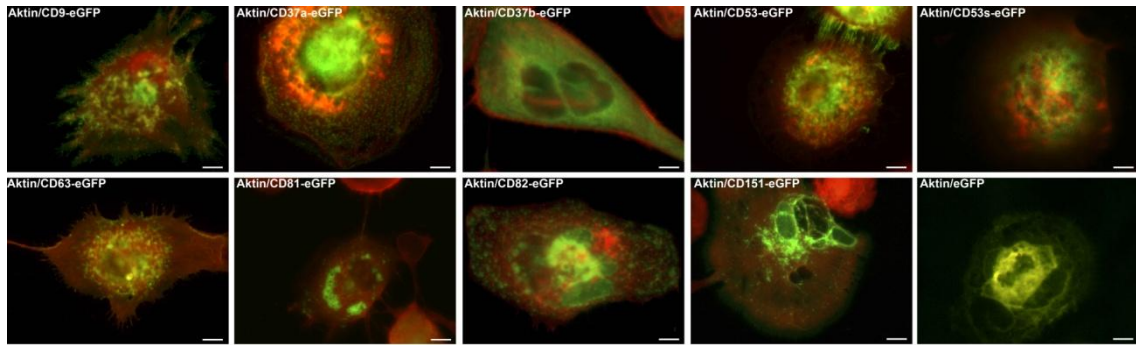


Abb. 7.8: Mikroskopische Aufnahmen von transduzierten THP1-Zellen.

Immunzytochemische Färbungen von Aktin (rot) in Tetraspanin-eGFP transduzierten und PMA stimulierten THP1-Zellen. (Maßstabsbalken immer 10 µm).

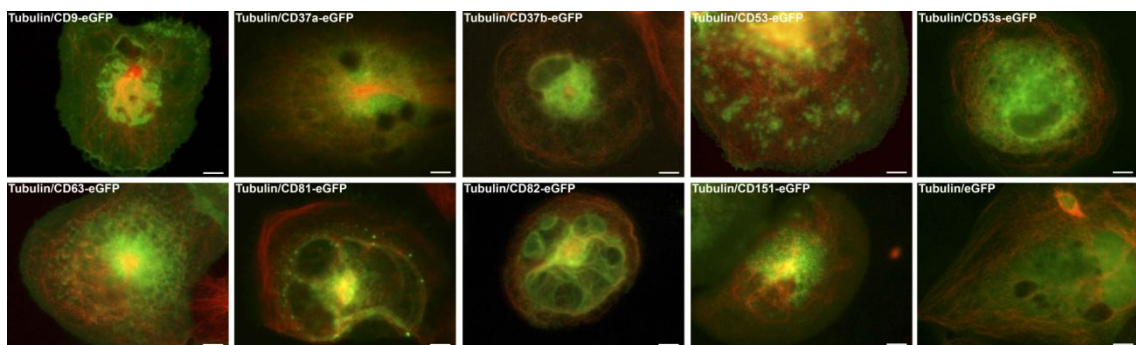


Abb. 7.9: Mikroskopische Aufnahmen von transduzierten THP1-Zellen.

Immunzytochemische Färbungen von Tubulin (rot) in Tetraspanin-eGFP transduzierten und PMA stimulierten THP1-Zellen. (Maßstabsbalken immer 10 µm).

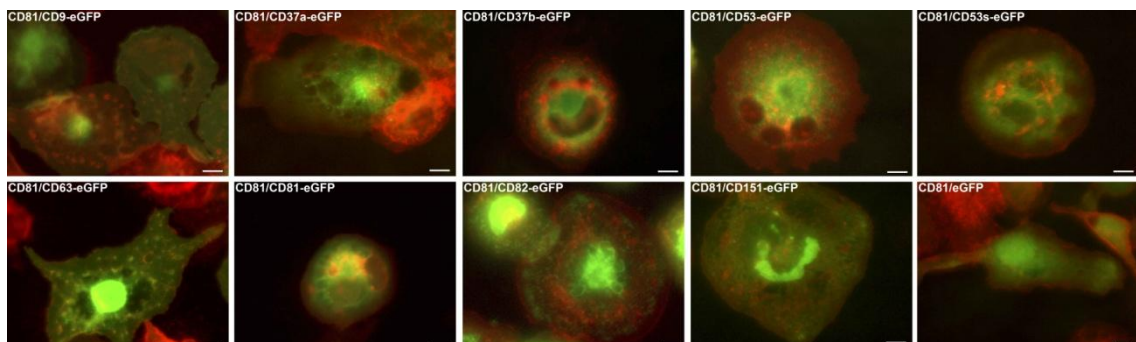


Abb. 7.10: Mikroskopische Aufnahmen transduzierten THP1-Zellen.

Immunzytochemische Färbungen von CD81 (rot) an Tetraspanin-eGFP transduzierten und PMA stimulierten THP1-Zellen. (Maßstabsbalken immer 10 µm).

7.5 Effekte von Transgenen auf das Entwicklungspotential von CD34⁺ Zellen

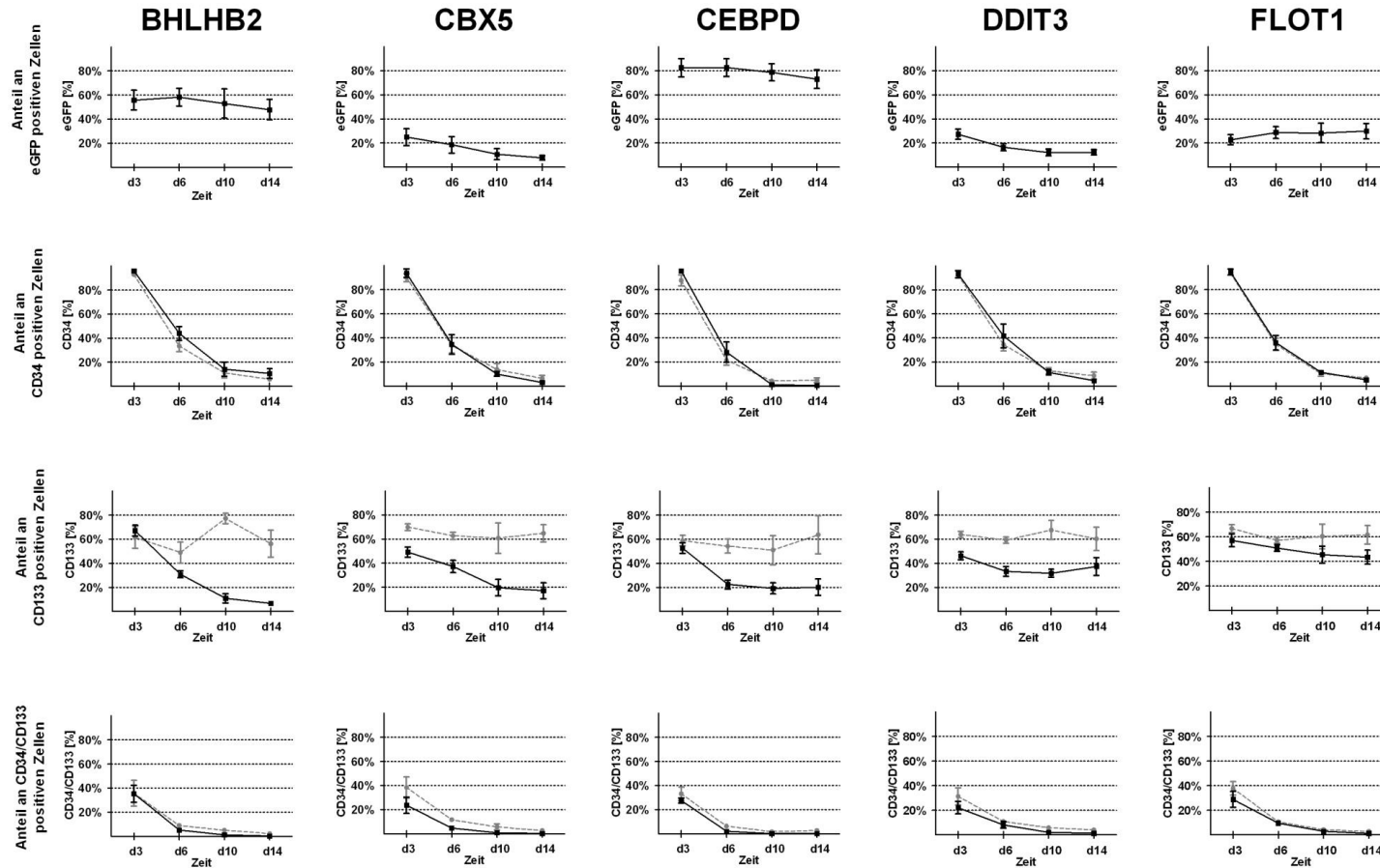


Abb. 7.11: Populationsanteile von transduzierten CD34⁺ Zellen.

Die prozentualen Werte von transduzierten (schwarz) und nicht-transduzierten CD34⁺ Zellen (grau) über einen Zeitraum von 14 Tagen (n=3, MW±SEM).

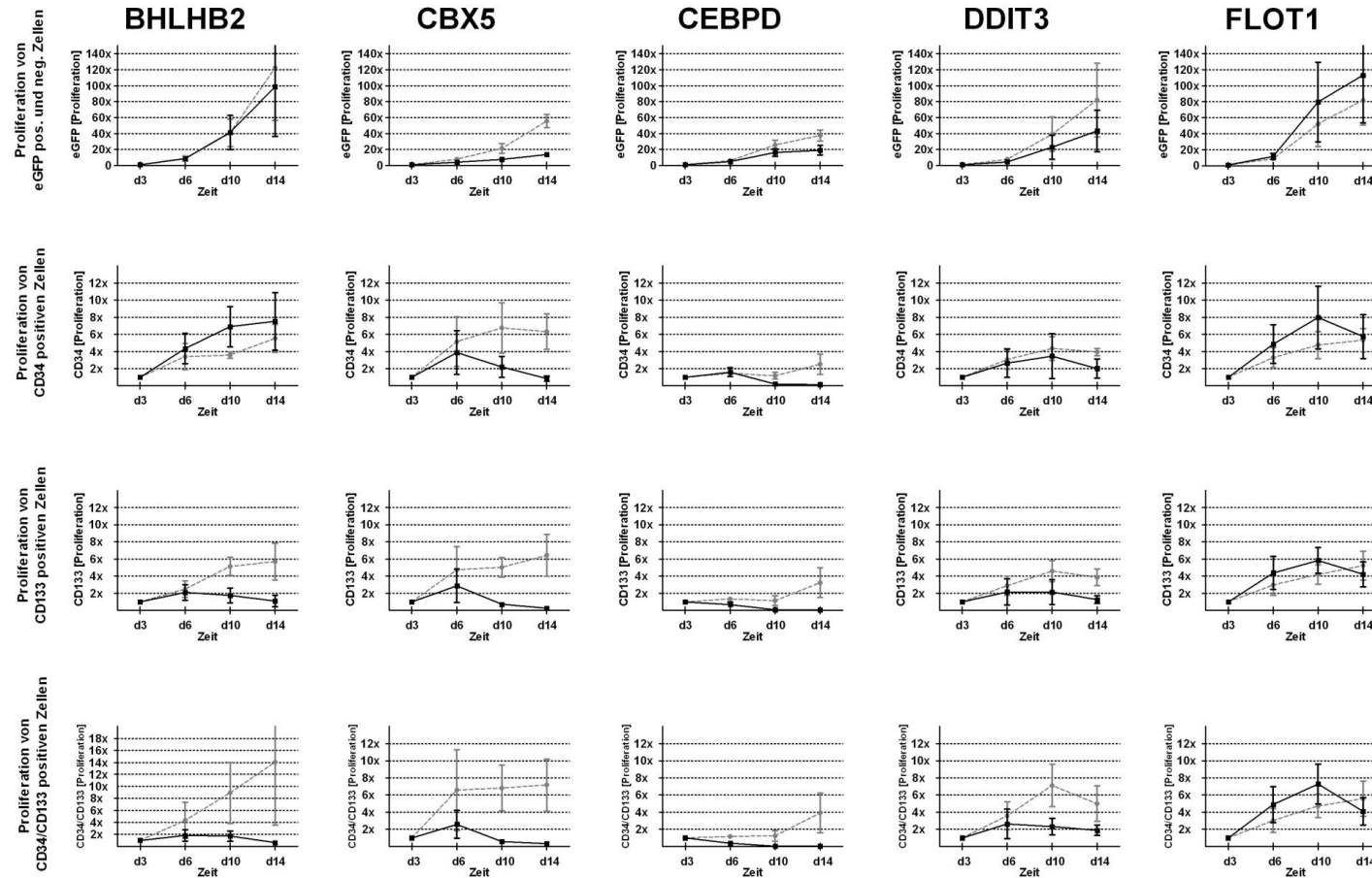


Abb. 7.12: Proliferationswerte von transduzierten CD34⁺ Zellen.

Proliferationsrate von transduzierten (schwarz) und nicht-transduzierten CD34⁺ Zellen (grau) über einen Zeitraum von 14 Tagen (n=3, MW±SEM).

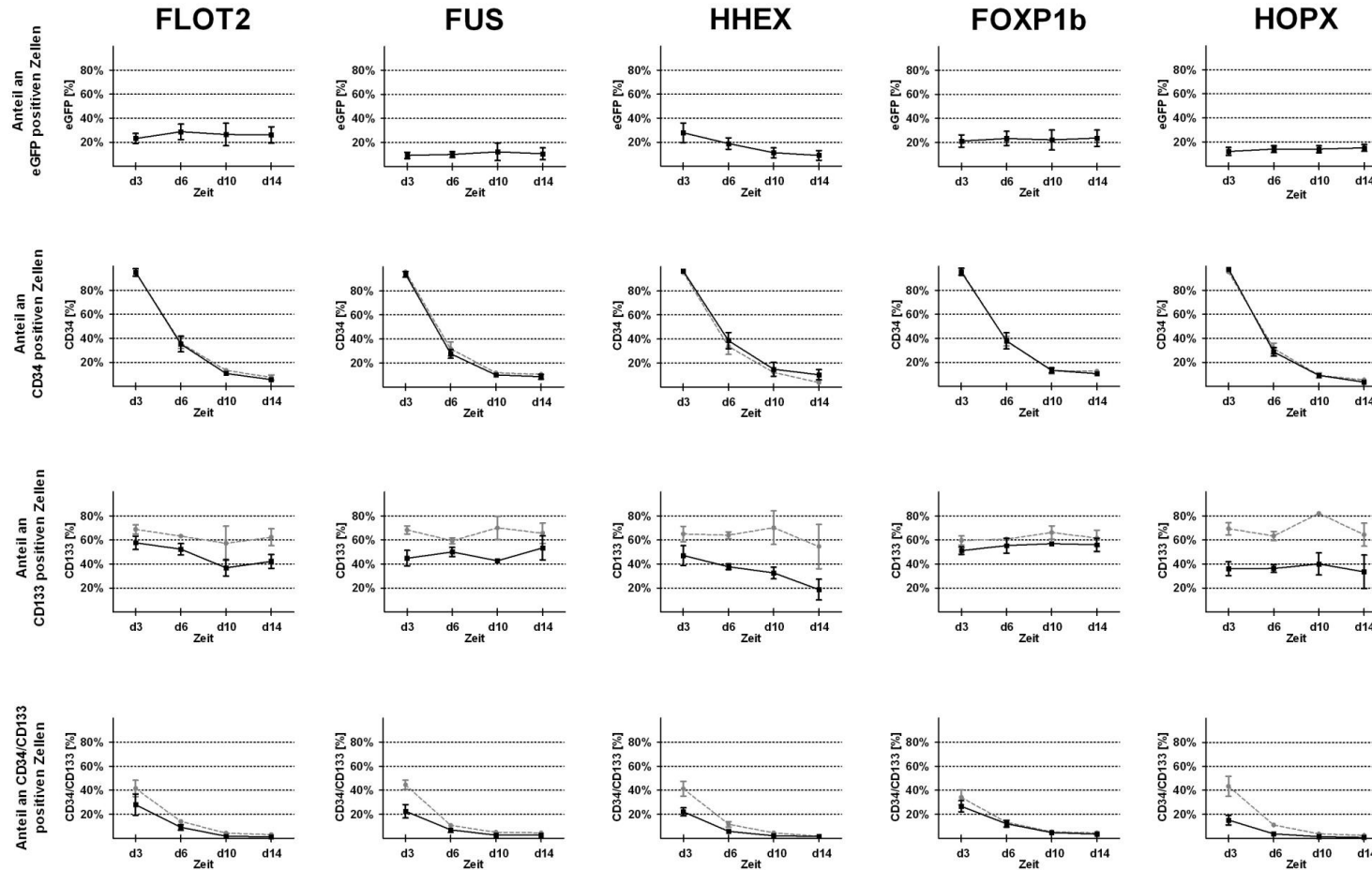


Abb. 7.13: Populationsanteile von transduzierten CD34⁺ Zellen.

Die prozentualen Werte von transduzierten (schwarz) und nicht-transduzierten CD34⁺ Zellen (grau) über einen Zeitraum von 14 Tagen (n=3, MW±SEM).

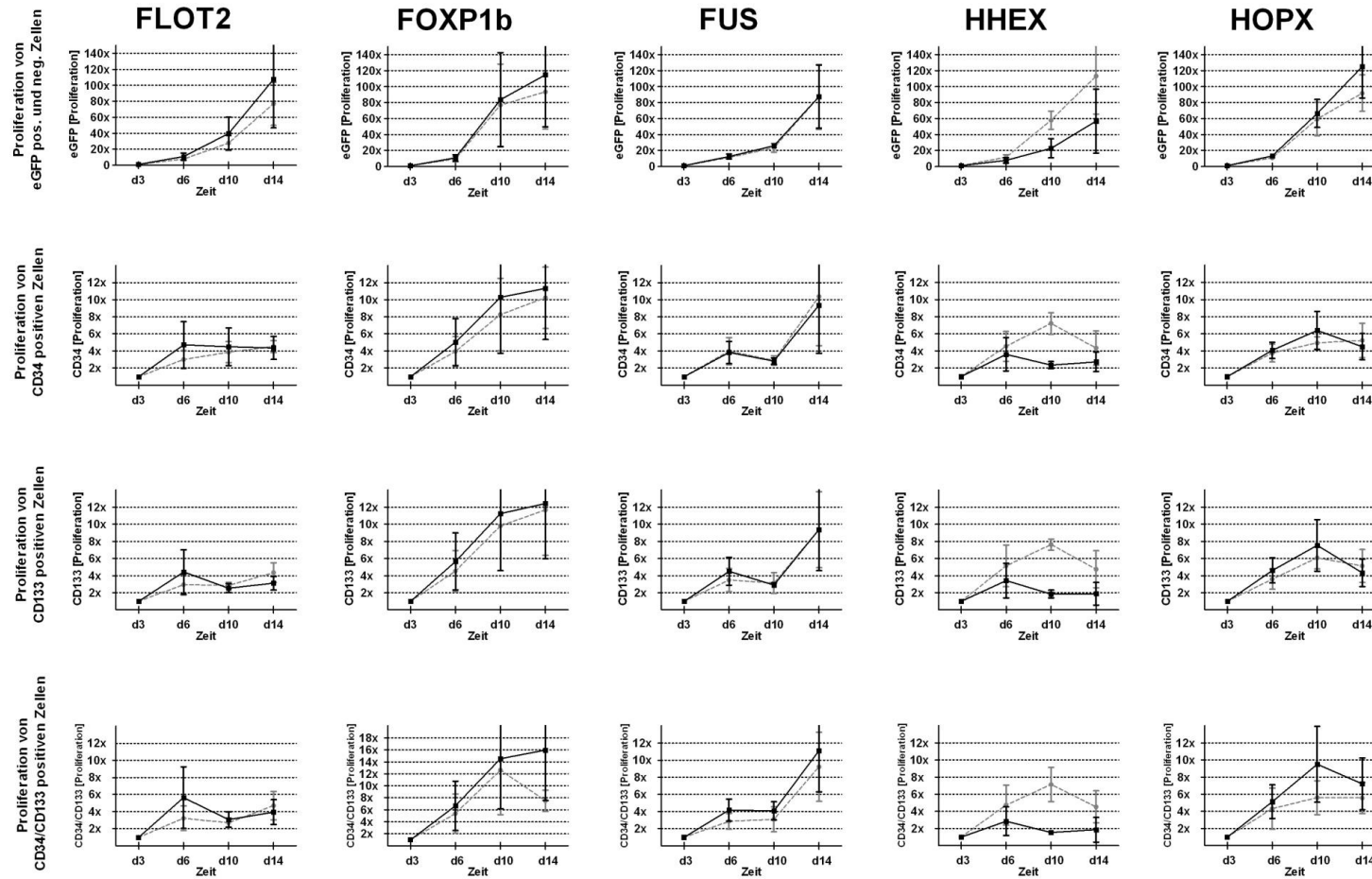


Abb. 7.14: Proliferationswerte von transduzierten CD34⁺ Zellen.

Proliferationsrate von transduzierten (schwarz) und nicht-transduzierten CD34⁺ Zellen (grau) über einen Zeitraum von 14 Tagen (n=3, MW±SEM).

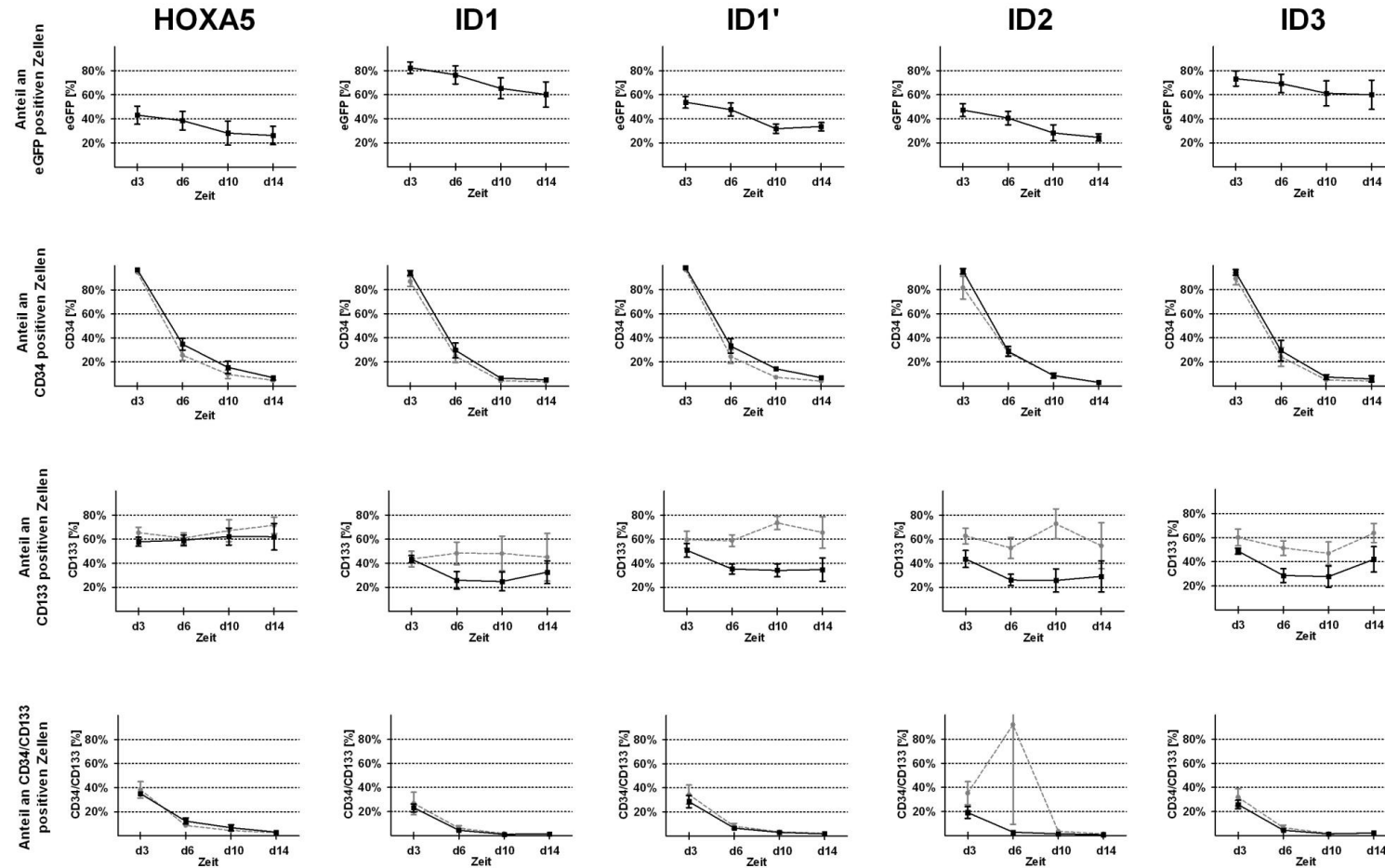


Abb. 7.15: Populationsanteile von transduzierten CD34⁺ Zellen.

Die prozentualen Werte von transduzierten (schwarz) und nicht-transduzierten CD34⁺ Zellen (grau) über einen Zeitraum von 14 Tagen (n=3, MW±SEM).

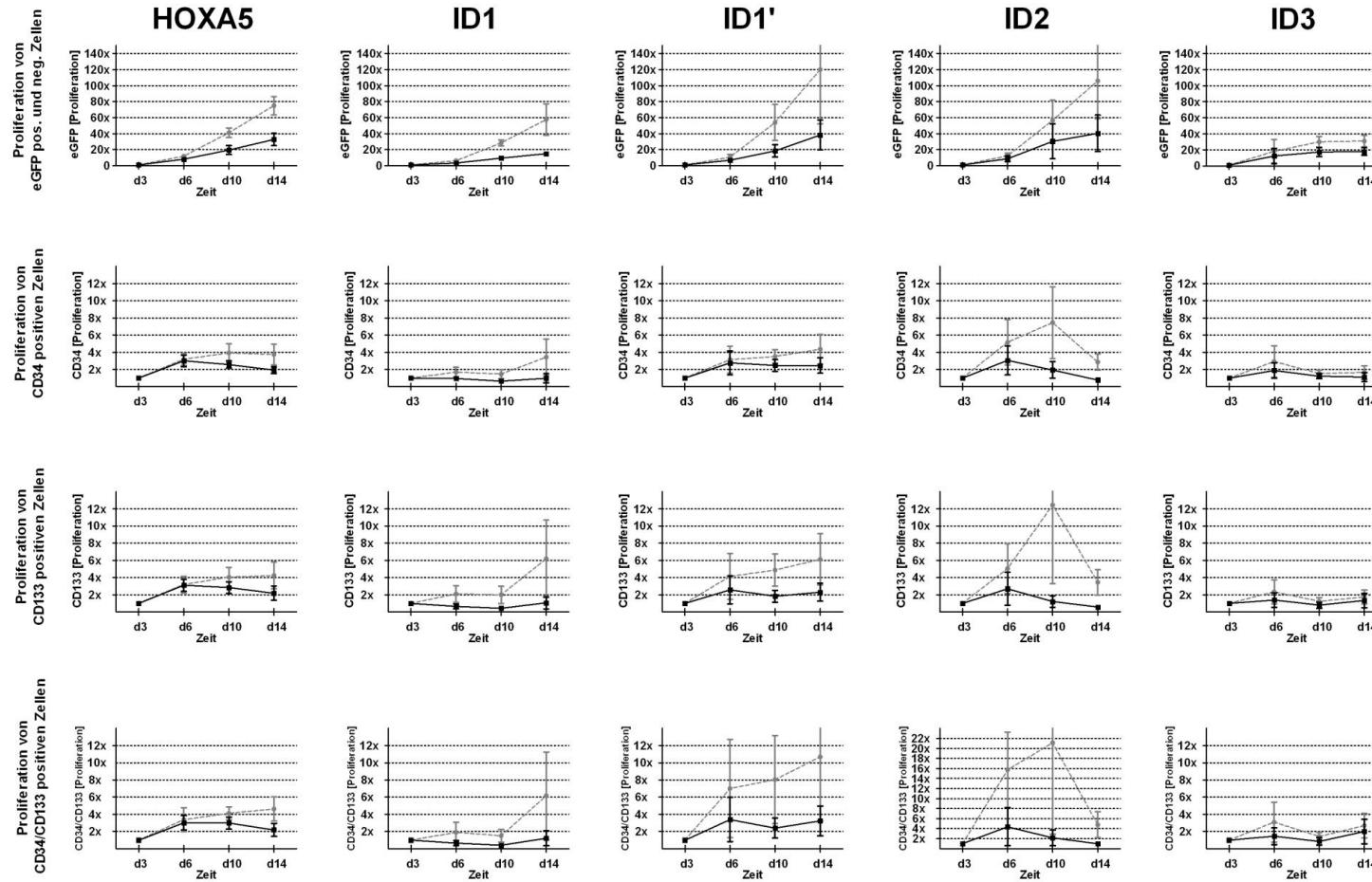


Abb. 7.16: Proliferationswerte von transduzierten CD34⁺ Zellen.

Proliferationsrate von transduzierten (schwarz) und nicht-transduzierten CD34⁺ Zellen (grau) über einen Zeitraum von 14 Tagen (n=3, MW±SEM).

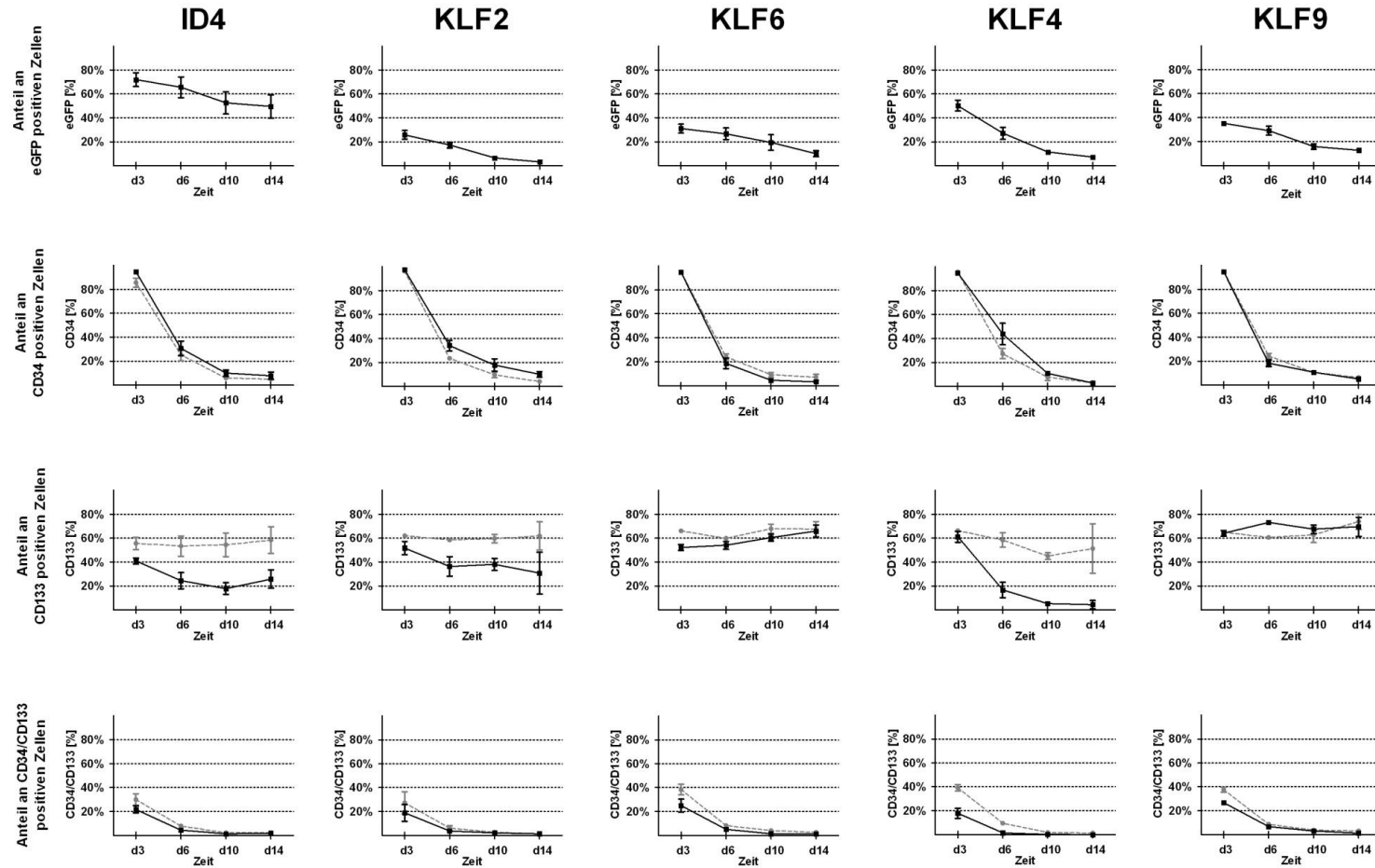


Abb. 7.17: Populationsanteile von transduzierten CD34⁺ Zellen.

Die prozentualen Werte von transduzierten (schwarz) und nicht-transduzierten CD34⁺ Zellen (grau) über einen Zeitraum von 14 Tagen (n=3, MW±SEM).

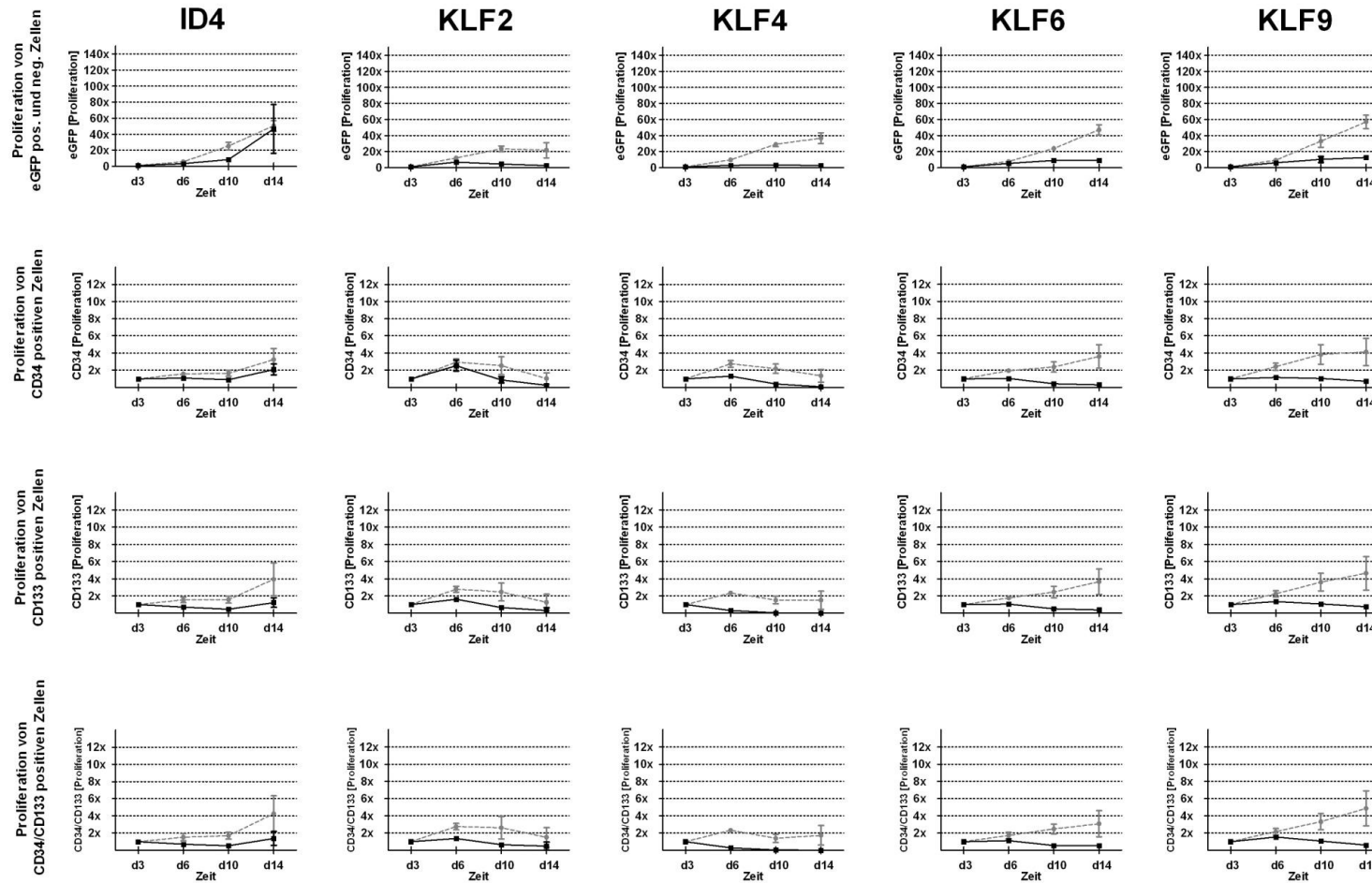


Abb. 7.18: Proliferationswerte von transduzierten $CD34^+$ Zellen.

Proliferationsrate von transduzierten (schwarz) und nicht-transduzierten $CD34^+$ Zellen (grau) über einen Zeitraum von 14 Tagen ($n=3$, $MW \pm SEM$).

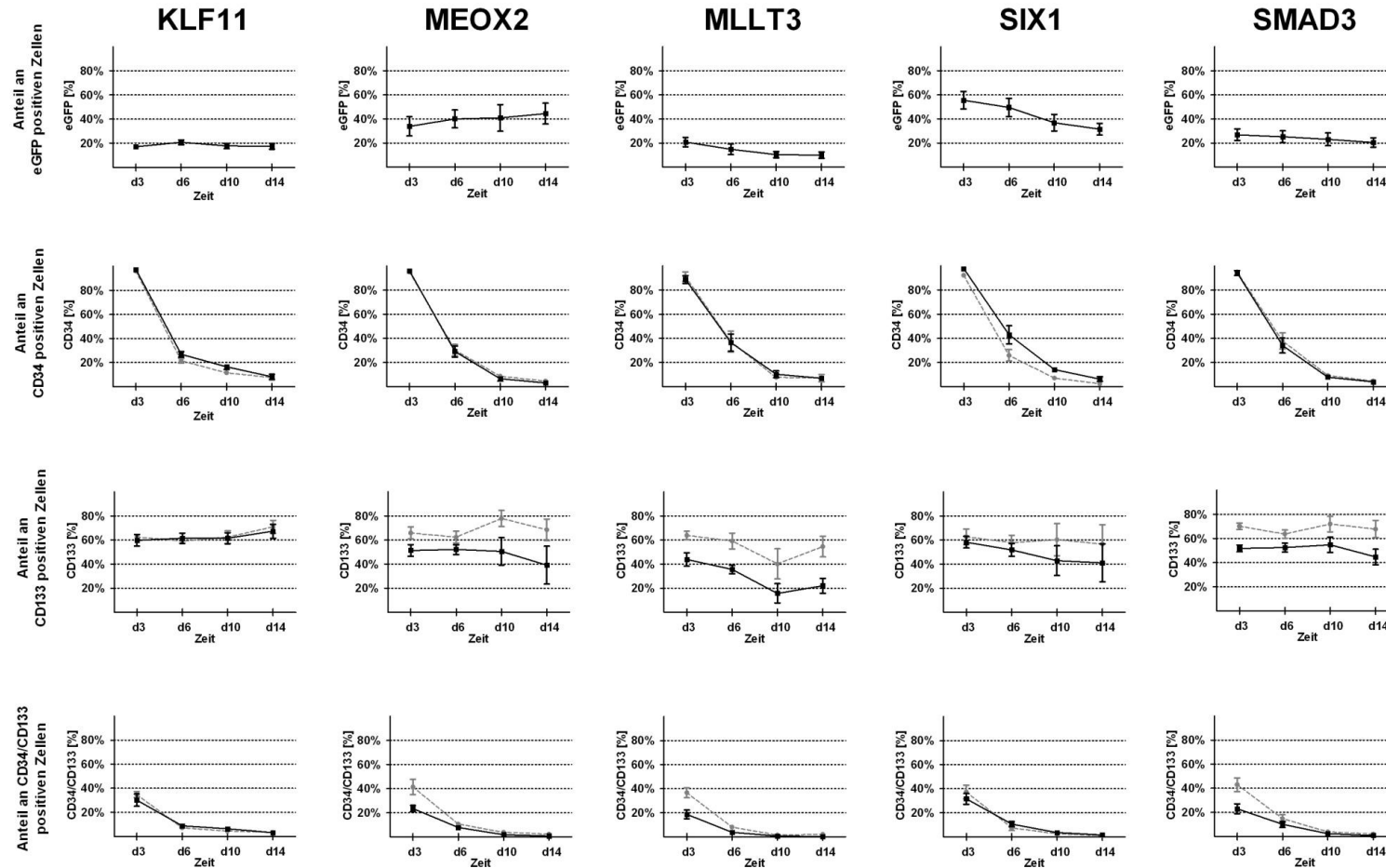


Abb. 7.19: Populationsanteile von transduzierten CD34⁺ Zellen.

Die prozentualen Werte von transduzierten (schwarz) und nicht-transduzierten CD34⁺ Zellen (grau) über einen Zeitraum von 14 Tagen ($n=3$, $MW \pm SEM$).

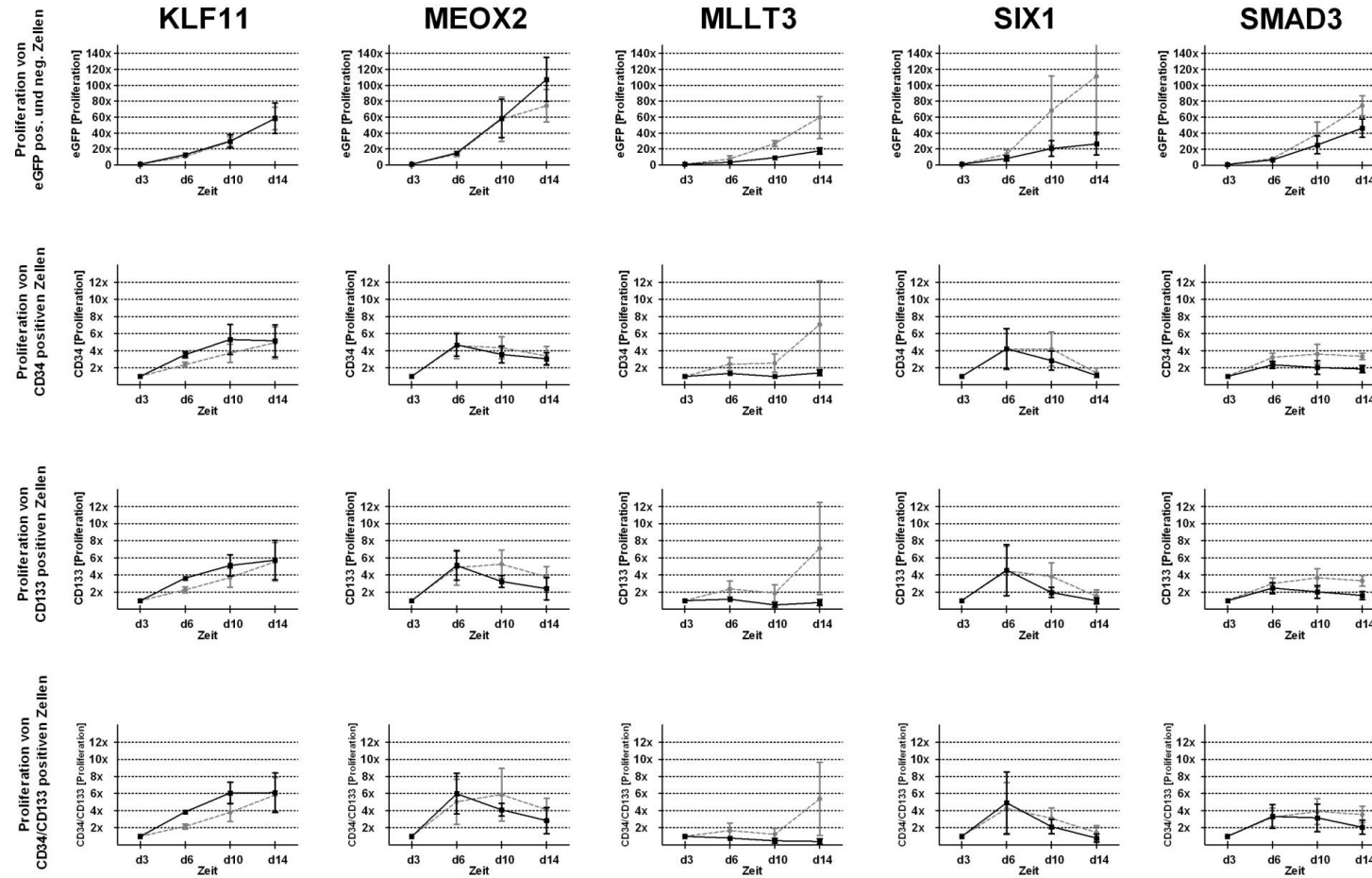


Abb. 7.20: Proliferationswerte von transduzierten CD34⁺ Zellen.

Proliferationsrate von transduzierten (schwarz) und nicht-transduzierten CD34⁺ Zellen (grau) über einen Zeitraum von 14 Tagen (n=3, MW±SEM).

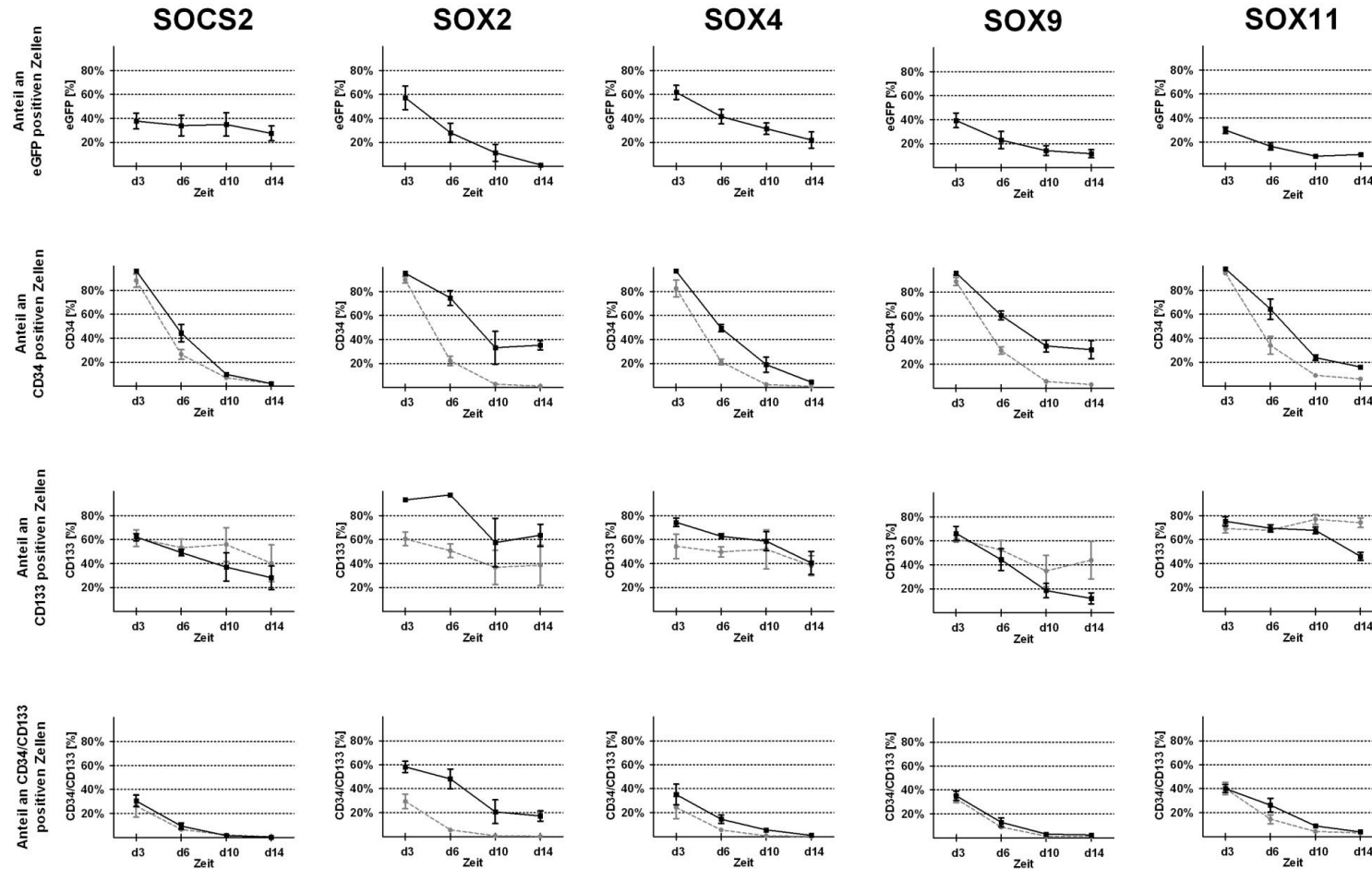


Abb. 7.21: Populationsanteile von transduzierten CD34⁺ Zellen.

Die prozentualen Werte von transduzierten (schwarz) und nicht-transduzierten CD34⁺ Zellen (grau) über einen Zeitraum von 14 Tagen ($n=3$, $MW \pm SEM$).

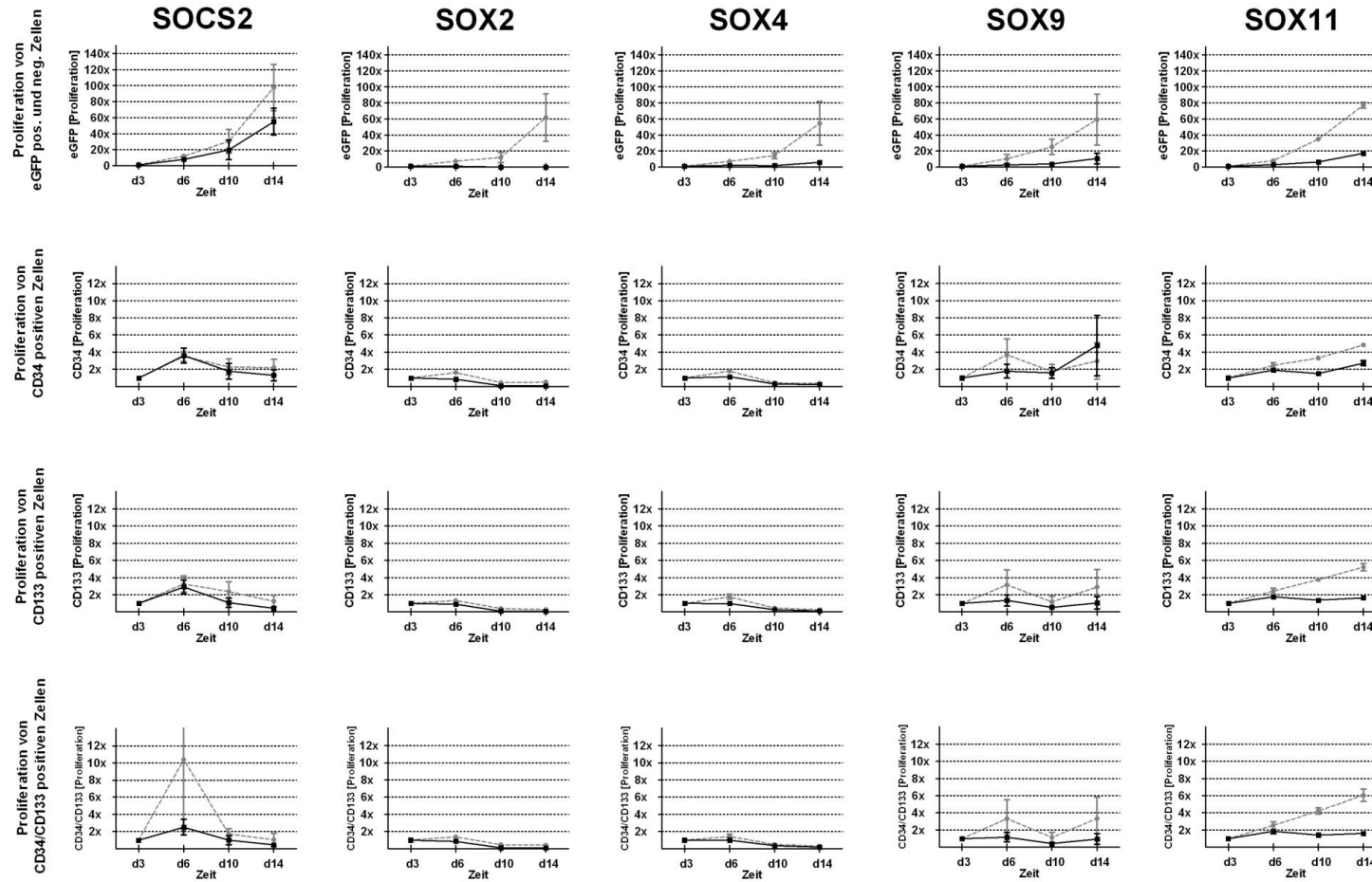


Abb. 7.22: Proliferationswerte von transduzierten CD34⁺ Zellen.

Proliferationsrate von transduzierten (schwarz) und nicht-transduzierten CD34⁺ Zellen (grau) über einen Zeitraum von 14 Tagen (n=3, MW±SEM).

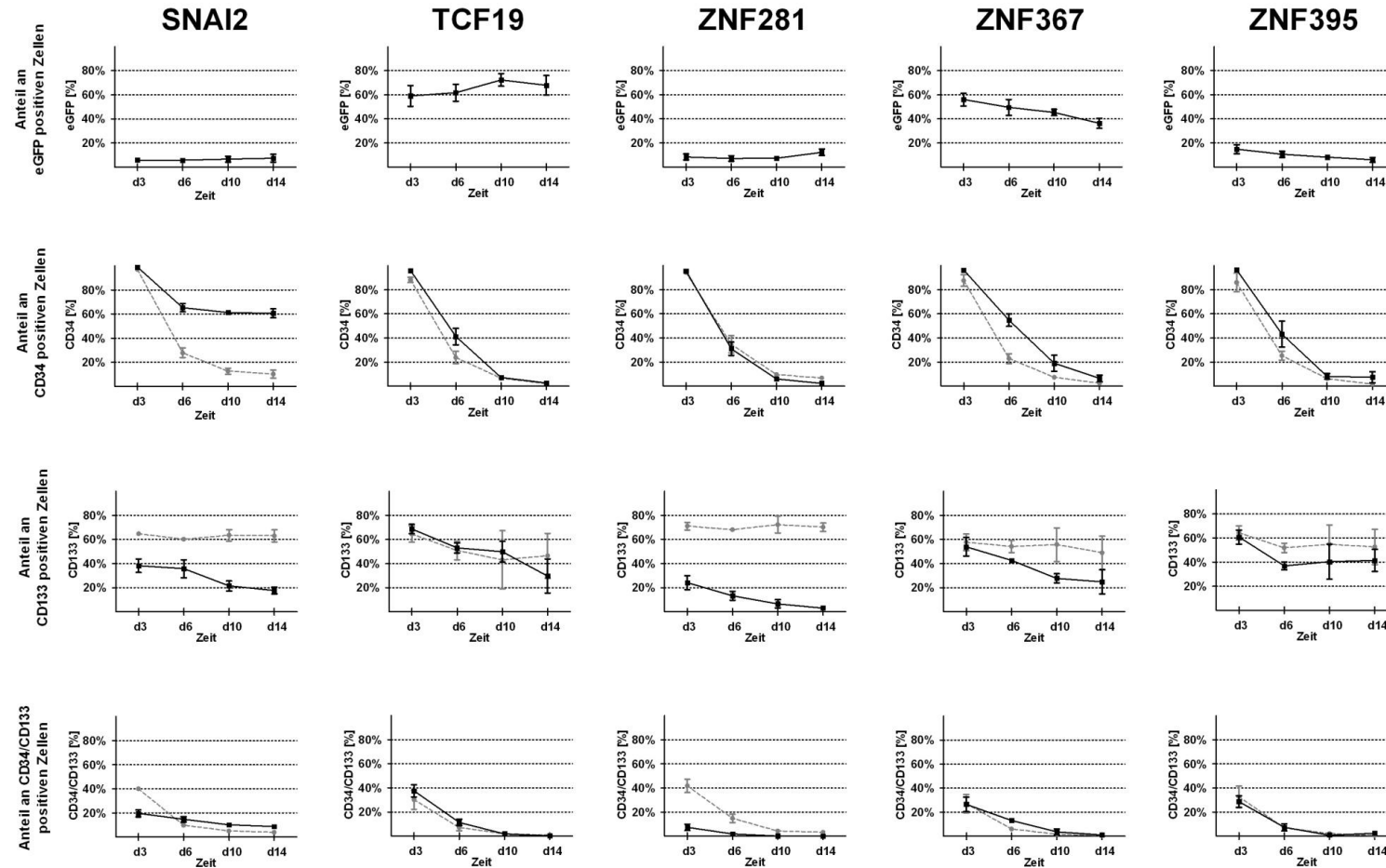


Abb. 7.23: Populationsanteile von transduzierten CD34⁺ Zellen.

Die prozentualen Werte von transduzierten (schwarz) und nicht-transduzierten CD34⁺ Zellen (grau) über einen Zeitraum von 14 Tagen (n=3, MW±SEM).

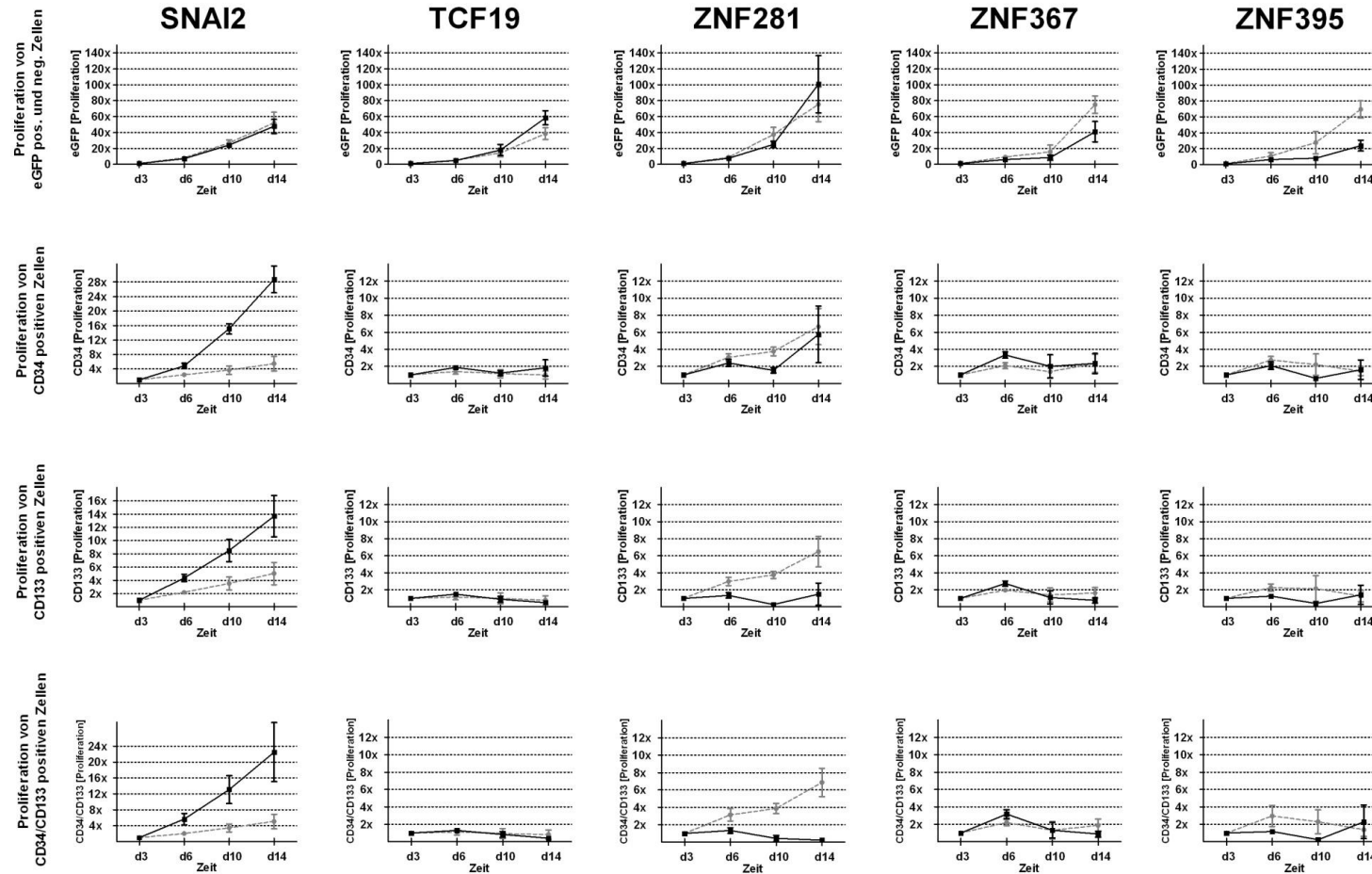


Abb. 7.24: Proliferationswerte von transduzierten CD34⁺ Zellen.

Die prozentualen Werte von transduzierten (schwarz) und nicht-transduzierten CD34⁺ Zellen (grau) über einen Zeitraum von 14 Tagen (n=3, MW±SEM).

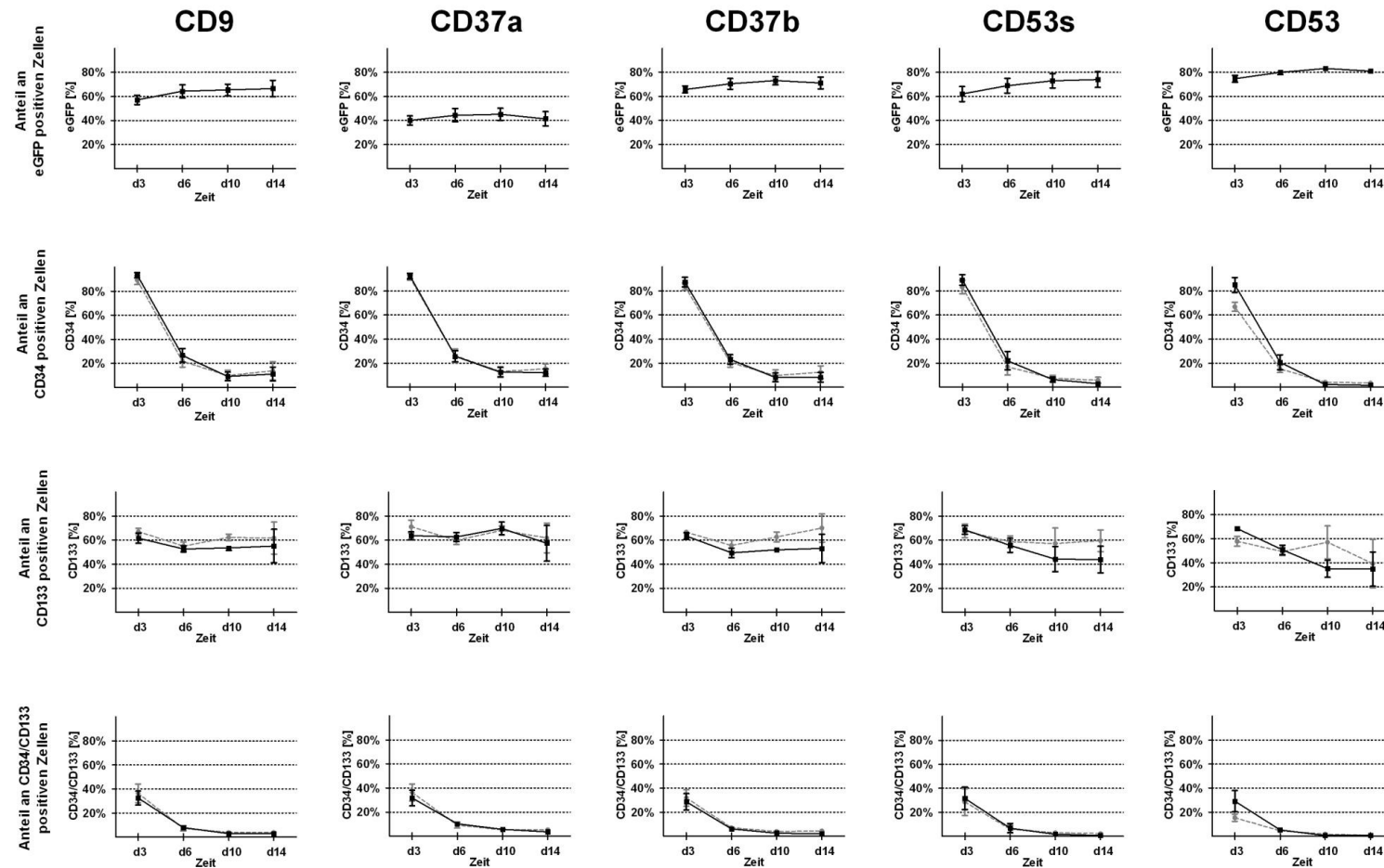


Abb. 7.25: Populationsanteile von transduzierten CD34⁺ Zellen.

Die prozentualen Werte von transduzierten (schwarz) und nicht-transduzierten CD34⁺ Zellen (grau) über einen Zeitraum von 14 Tagen ($n=3$, $MW \pm SEM$).

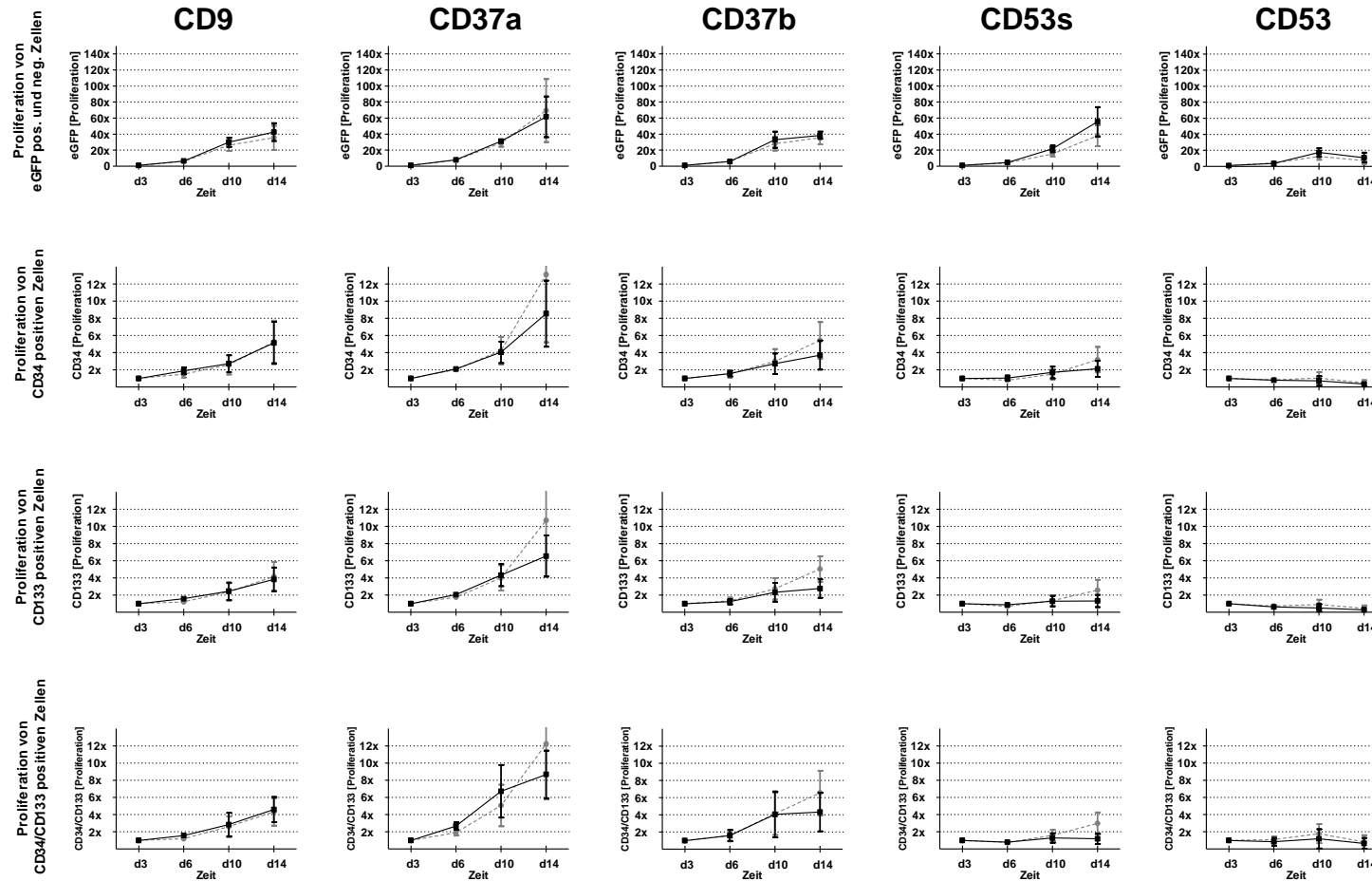


Abb. 7.26: Proliferationswerte von transduzierten CD34⁺ Zellen.

Proliferationsrate von transduzierten (schwarz) und nicht-transduzierten CD34⁺ Zellen (grau) über einen Zeitraum von 14 Tagen (n=3, MW±SEM).

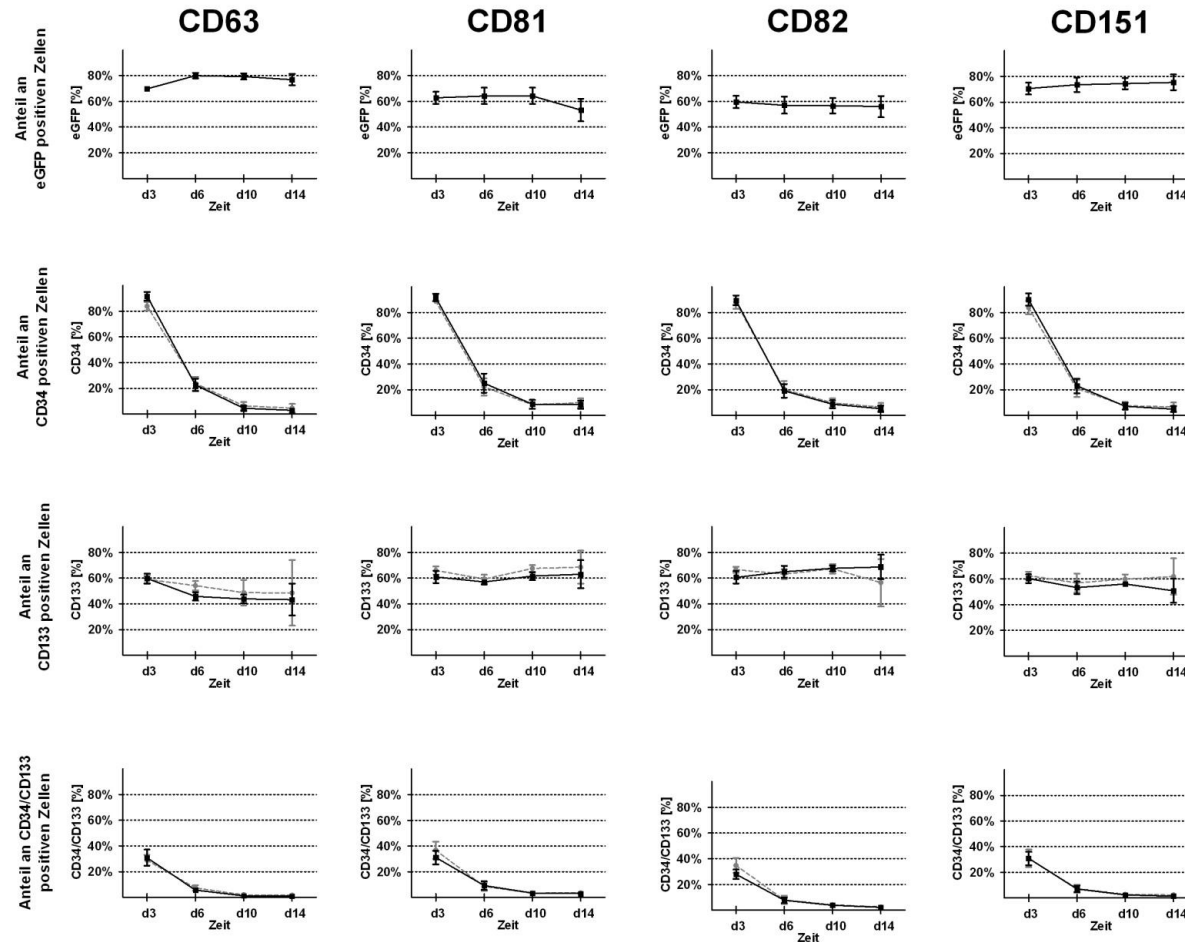


Abb. 7.27: Populationsanteile von transduzierten CD34⁺ Zellen.

Die prozentualen Werte von transduzierten (schwarz) und nicht-transduzierten CD34⁺ Zellen (grau) über einen Zeitraum von 14 Tagen ($n=3$, $MW \pm SEM$).

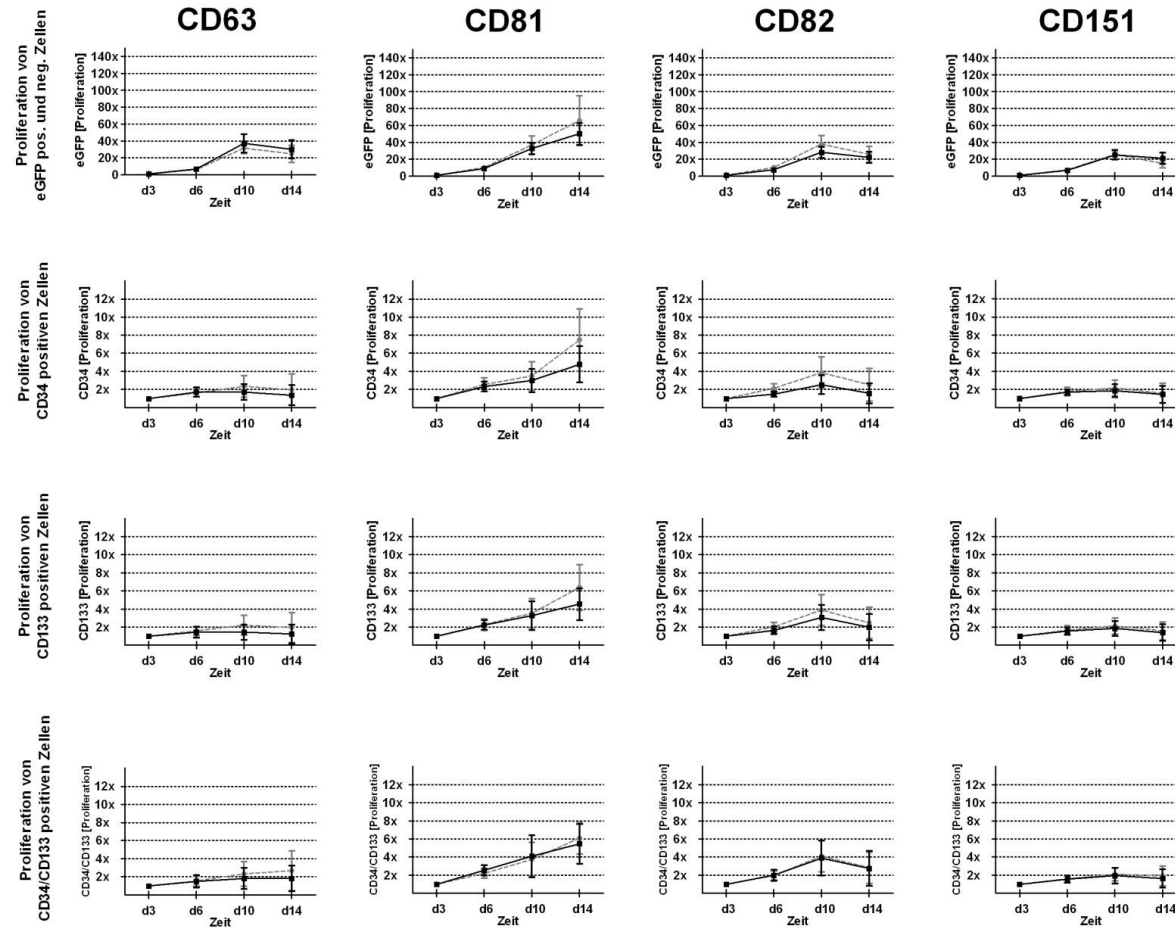


Abb. 7.28: Proliferationswerte von transduzierten CD34⁺ Zellen.

Proliferationsrate von transduzierten (schwarz) und nicht-transduzierten CD34⁺ Zellen (grau) über einen Zeitraum von 14 Tagen (n=3, MW±SEM).

Tab. 7.1: P-Werte der Signifikanzberechnungen der Expansionsraten von transduzierten Zellen.

Die Werte wurden mit dem T-Test, zweiseitig, gepaart ermittelt. Werte $\leq 0,05$ sind grau markiert.

Signifikanzberechnung gegen	GFP+		CD34+GFP+		CD133+GFP+		Doppelt Positiv	
	LV-Ktrl.	interne Ktrl.	LV-Ktrl.	interne Ktrl.	LV-Ktrl.	interne Ktrl.	LV-Ktrl.	interne Ktrl.
CEBPD	0,538	0,036	0,378	0,143	0,376	0,168	0,383	0,192
ID1	0,349	0,091	0,472	0,218	0,438	0,270	0,410	0,327
ID3	0,394	0,124	0,540	0,342	0,487	0,452	0,437	0,084
ID4	0,808	0,921	0,998	0,469	0,514	0,137	0,435	0,113
MLLT3	0,408	0,174	0,691	0,327	0,436	0,296	0,383	0,296
SOX9	0,189	0,147	0,209	0,294	0,438	0,266	0,409	0,290
HHEX	0,139	0,158	0,709	0,283	0,622	0,208	0,548	0,087
HOPx	0,517	0,453	0,135	0,796	0,239	0,677	0,222	0,693
HOXA5	0,097	0,016	0,719	0,146	0,208	0,073	0,094	0,040
ID1'	0,181	0,064	0,506	0,165	0,530	0,178	0,883	0,177
ID2	0,191	0,016	0,303	0,258	0,383	0,289	0,692	0,181
MEOX2	0,119	0,269	0,301	0,926	0,195	0,379	0,151	0,457
SIX1	0,185	0,123	0,405	0,497	0,537	0,347	0,636	0,194
BHLHB2	0,239	0,032	0,438	0,679	0,100	0,088	0,186	0,099
CBX5	0,009	0,039	0,039	0,067	0,104	0,114	0,186	0,151
DDIT3	0,001	0,053	0,077	0,028	0,126	0,069	0,138	0,176
FLOT1	0,911	0,882	0,561	0,425	0,249	0,305	0,355	0,223
FLOT2	0,591	0,506	0,591	0,353	0,236	0,230	0,209	0,133
FOXP1b	0,774	0,140	0,318	0,165	0,256	0,302	0,121	0,425
FUS	0,364	0,709	0,660	0,545	0,747	0,761	0,432	0,657
KLF2	0,116	0,132	0,076	0,248	0,052	0,279	0,039	0,271
KLF4	0,110	0,026	0,055	0,225	0,031	0,288	0,018	0,270
KLF6	0,112	0,020	0,054	0,132	0,031	0,147	0,026	0,255
KLF9	0,129	0,027	0,052	0,143	0,027	0,158	0,016	0,147
KLF11	0,221	0,979	0,472	0,667	0,847	0,150	0,888	0,605
SNAI2	0,414	0,827	0,035	0,047	0,177	0,192	0,173	0,181
SMAD2	0,312	0,037	0,060	0,147	0,610	0,144	0,282	0,068
SOC52	0,598	0,063	0,356	0,201	0,062	0,288	0,190	0,451
SOX2	0,133	0,129	0,016	0,047	0,011	0,261	0,064	0,233
SOX4	0,156	0,142	0,012	0,088	0,009	0,088	0,075	0,056
SOX11	0,182	0,000	0,306	0,002	0,647	0,003	0,522	0,013
TCF19	0,053	0,099	0,759	0,558	0,215	0,572	0,488	0,360
ZNF281	0,122	0,428	0,512	0,243	0,019	0,087	0,280	0,113
ZNF367	0,193	0,170	0,923	0,941	0,068	0,142	0,658	0,168
ZNF395	0,185	0,067	0,870	0,905	0,877	0,922	0,646	0,720
CD9	0,584	0,215	0,552	0,800	0,742	0,730	0,347	0,614
CD37a	0,780	0,640	0,299	0,383	0,280	0,420	0,092	0,476
CD37b	0,243	0,583	0,798	0,144	0,828	0,140	0,672	0,065
CD53	0,095	0,260	0,061	0,260	0,078	0,241	0,292	0,493
CD53s	0,928	0,091	0,528	0,194	0,284	0,169	0,333	0,163
CD63	0,335	0,351	0,381	0,439	0,361	0,373	0,688	0,384
CD81	0,882	0,440	0,531	0,257	0,572	0,295	0,378	0,611
CD82	0,157	0,334	0,430	0,309	0,626	0,329	0,961	0,872
CD151	0,135	0,064	0,357	0,515	0,364	0,257	0,606	0,277

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben und helfend zur Seite standen.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Peter Horn bedanken, der mir die Möglichkeit gab dieses Thema am Institut für Transfusionsmedizin zu bearbeiten und trotz vollem Terminkalender stets ein offenes Ohr für seine Mitarbeiter hat.

Weiterhin gilt mein Dank meinem Betreuer PD Dr. rer. nat. Bernd Giebel für die Vergabe des interessanten Themas. Durch die intensive Betreuung habe ich viele neue Arbeitstechniken erlernt. Seine beharrliche Diskussionsbereitschaft lehrte mich, Ergebnisse nicht vorschnell zu interpretieren sondern kritisch zu hinterfragen.

Vielen Dank an alle Ärzte, Schwestern und Hebammen der Frauenklinik, besonders Prof. Dr. med. Rainer Kimmig, für die stetige Versorgung mit Nabelschnurblut.

Mein besonderer Dank gilt meinen Mitstreitern der AG Giebel: Ich möchte euch allen für eure Hilfsbereitschaft, den Spaß und den Zusammenhalt untereinander danken.

Danke dir Andre, für die Hilfe am FC500 und dem Sorter. Vor allem für die Planung der Gates und die Hilfe bei den Details, und für so manche heitere Stunde - BAZINGA. Vielen Dank an dich Stefan, ebenfalls für die Hilfe bei der Durchflusszytometrie und für den Medien-Ausgleich. Danke dir Anna, für die vielen leckeren Kuchen und das Gebäck im Winter. Danke Liska, dass du immer ein offenes Ohr hattest und hast.

Mein größter Dank gilt meiner Frau, die mich immer unterstützt hat. DANKE